

UNIVERSITY OF HAWAII
LIBRARY
JUN 24 '64

ARCHIV FÜR MIKROBIOLOGIE

BEGRÜNDET VON
J. BEHRENS F. BOAS A. RIPPEL

HERAUSGEGEBEN VON

C. B. VAN NIEL
PACIFIC GROVE

R. NILSSON
UPPSALA

E. G. PRINGSHEIM
CAMBRIDGE

W. H. SCHOPFER
BERN

H. TAMIYA
TOKIO

UND DEN SCHRIFTFLEITERN

A. RIPPEL-BALDES
GÖTTINGEN

R. HARDER
GÖTTINGEN

17. BAND · 3. HEFT

MIT 45 TEXTABBILDUNGEN

(ABGESCHLOSSEN AM 15. JULI 1952)



BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG
SPRINGER-VERLAG

1952

Das

Archiv für Mikrobiologie

steht Originalarbeiten und Sammelreferaten aus dem Gesamtgebiet der pflanzlichen Mikroorganismen offen. Arbeiten, die nur praktischen Zwecken dienen, scheiden aus, während im übrigen alle wissenschaftlichen Fragen aus „reinen“ und „angewandten“ Gebieten berücksichtigt werden.

Das „Archiv“ erscheint nach Maßgabe des eingehenden Materials. Der Preis des Bandes beträgt DM 96.—.

Der Autor erhält einen Unkostenersatz von DM 20.— für den 16 seitigen Druckbogen, jedoch im Höchstfalle DM 30.— für eine Arbeit. Sammelreferate werden mit DM 40.— für den Druckbogen honoriert.

Es wird ausdrücklich darauf aufmerksam gemacht, daß mit der Annahme des Manuskriptes und seiner Veröffentlichung durch den Verlag das ausschließliche Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder an den Verlag übergeht. Grundsätzlich dürfen nur Arbeiten eingereicht werden, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind, und die auch nachträglich nicht anderweitig zu veröffentlichen der Autor sich verpflichtet.

Es ist ferner ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages nicht gestattet, photographische Vervielfältigungen, Mikrofilme, Mikrophoto u. ä. von den Zeitschriftenheften, von einzelnen Beiträgen oder von Teilen daraus herzustellen.

Die Mitarbeiter erhalten von ihren Arbeiten 75 Sonderdrucke unentgeltlich.

Manuskripte erbeten an:

Prof. Dr. C. B. van Niel, California/USA, Pacific Grove, Stanford University, Hopkins Marine Station

Prof. Dr. R. Nilsson, Uppsala 7/Schweden, Kungl. Lantbrukshögskolan, Mikrobiologiska Institution

Prof. Dr. E. G. Pringsheim, Cambridge/England, Botany School, Downing Street,

Prof. Dr. W. H. Schopfer, Bern/Schweiz, Botanisches Institut der Universität,

Prof. Dr. H. Tamiya, Tokio/Japan, 41, Mejiro-Machi 4th St., The Tokugawa Institute for Biological Research,

oder an die

Schriftleitung:

Prof. Dr. A. Rippel-Baldes, Göttingen, Institut für Mikrobiologie, Goßlerstr. 16

Prof. Dr. R. Harder, Göttingen, Pflanzenphysiolog. Institut, Nikolausberger Weg 18.

Springer-Verlag

Berlin · Göttingen · Heidelberg

Vertriebsvertretung im Ausland:

Lange, Maxwell & Springer Ltd., 41-45 Neal Street, London W. C. 2

17. Band

Inhaltsverzeichnis.

3. Heft

Seite

AACH, H. G., Über Wachstum und Zusammensetzung von <i>Chlorella pyrenoidosa</i> bei unterschiedlichen Lichtstärken und Nitratsmengen. Mit 14 Textabbildungen	213
SÖRGEL, G., Dauerorganbildung bei <i>Rozella allomycis</i> Foust, ein Beitrag zur Kenntnis der Sexualität der niederen Phycomyceten. Mit 5 Textabbildungen	247
FRANKE, W., EZZ-ELDIN M. TAHA und L. KRIEG, Purinoxydierende Fermente aus Schimmelpilzen. I. Mitteilung: Über die Uricase der Schimmelpilze. Mit 8 Textabbildungen	255
KNAPP, R., und H. LIETH, Über Ursachen des verstärkten Auftretens von erdbewohnenden Cyanophyceen	292
KREITMAIER, G., B-Vitamine und Aminosäuren als Wachstumsstimulanten bei <i>Paramaecium caudatum</i> (Ehrbg.). Mit 18 Textabbildungen	300

Durch ein Versehen sind die beiden folgenden, in Heft 2 erschienenen Arbeiten im Inhaltsverzeichnis von Heft 2 nicht enthalten gewesen:

GUTTENBERG, H. v., und I. STRUTZ, Zur Keimungsphysiologie von <i>Ustilago zeae</i>	189
VAN UDEN, N., Zur Kenntnis von <i>Torulopsis Pintolopesii</i> sp. nov. Mit 1 Textabbildung	199

(Aus dem Pflanzenphysiologischen und dem Physiologisch-chemischen Institut
der Universität Göttingen.)

Über Wachstum und Zusammensetzung von *Chlorella pyrenoidosa* bei unterschiedlichen Lichtstärken und Nitratmengen.*

Von
H. G. AACH.

Mit 14 Abbildungen im Text.

(Eingegangen am 29. Februar 1952.)

Durch die Benutzung autotropher Einzeller als Versuchsobjekte in Manometergefäßen (WARBURG, 1919) ist das Studium der Lichtwirkung auf die Pflanzen sehr gefördert worden. Das Hauptinteresse war dabei und auch bei den zahlreichen folgenden Untersuchungen meist auf die Quantenausbeute bei der Kohlensäureassimilation gerichtet (WARBURG u. NEGELEIN, 1922; EICHHOFF, 1939; EMERSON u. Lewis, 1941; RIEKE, 1949; BURK u. WARBURG, 1951, u. a.), teils auch auf die Erzielung von Massenernten (z. B. HARDER u. v. WITSCH, 1942 a; SPOEHR, 1951; PEARSALL u. FOGG, 1951, u. a.). Eine Untersuchung der dabei gebildeten Algensubstanz ist bei solchen Versuchen nur selten durchgeführt worden; geschehen ist es z. B. durch MYERS (1946 a u. b) und durch SPOEHR und MILNER (1949), die durch Elementaranalysen von *Chlorella* gezeigt haben, daß die Zusammensetzung dieser Alge außerordentlichen Schwankungen unterworfen sein kann. Neben dem Licht als Energiequelle kommt hierbei dem Stickstoff als Eiweißbaustein gegenüber anderen Faktoren besondere Bedeutung zu.

Quantitativen Zusammenhängen zwischen diesen beiden Faktoren einerseits und der Entwicklung der Algen andererseits soll deshalb im folgenden besondere Aufmerksamkeit gewidmet werden.

I. Methodisches.

1. Versuchspflanzen.

Die Versuche wurden in der Hauptsache mit einem bakterienfreien Klon von *Chlorella pyrenoidosa* CHICK¹ durchgeführt², vergleichsweise

* Dissertation der math.-nat. Fakultät in Göttingen.

¹ Für die Bestimmung der Art bin ich Herrn Prof. E. PRINGSHEIM, Cambridge, zu großem Dank verpflichtet.

² Der Stamm wurde 1944 im Göttinger Botanischen Garten isoliert und bereits von v. WITSCH (1946, 1948) und von BURK und WARBURG (1951) zu Versuchen benutzt.

auch mit *Scenedesmus obliquus* (TURPIN) KÜTZING¹ (siehe Fußnote ¹ auf vorhergehender Seite) und *Ankistrodesmus falcatus* (CHORDA) RALPHS¹.

2. Kulturmethode.

a) Kulturgefäße.

Die Algen wurden in röhrenförmigen, durchlüftbaren Kulturgefäßen (G in Abb. 1) aus Glas (HARDER u. v. WITSCH, 1942 b) von verschiedener Größe gezogen, die von innen durch eine in die Nährlösung (N) tauchende Leuchtstofflampe (L)² beleuchtet wurden.

Die Anordnung erinnert an eine Apparatur von KETCHUM und Mitarbeitern (KETCHUM u. REDFIELD, 1938; SCOTT, 1943; KETCHUM, LILICK u. REDFIELD, 1949), bei der eine Neonlampe, die aber noch von einem besonderen Wasserkühlmantel umgeben war, in einen großen Kulturkolben tauchte.

Bei kleinen Röhren mit 1 bzw. 1,5 l Inhalt wurden Leuchtstofflampen Osram HNG 70 von 70 cm Länge benutzt. Sie ragten aus den Glasröhren beiderseits 2,5 cm heraus (Abb. 1), sodaß die elektrischen Anschlüsse frei zugänglich waren. Die Glasröhren — sie standen senkrecht nebeneinander in einem Gestell — waren unten durch einen Gummistopfen (St) und oben durch eine Gummikappe (K) verschlossen. Beide Verschlüsse hatten neben je einer großen zentralen Bohrung für die Enden der Leuchtstofflampen

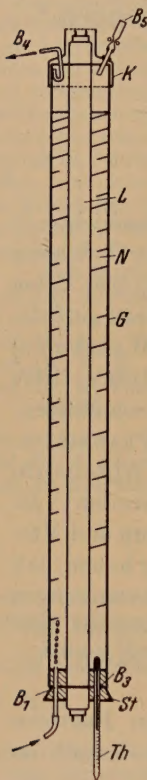


Abb. 1.

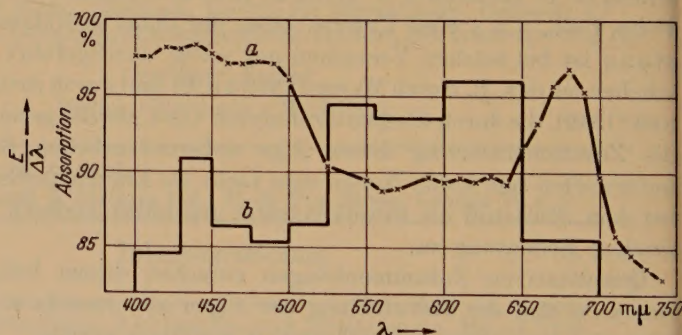


Abb. 2.

Abb. 1. Kulturgefäß G für 1 l Nährlösung mit Leuchtstoffröhre L in der Nährlösung N. St Gummistopfen mit den Durchlüftungsbohrungen B₁ und B₂ (nicht sichtbar) und der Bohrung B₃ für das Thermometer Th. K Gummikappenverschluß mit den Öffnungen B₄ zum Luftaustritt und B₅ zum Belpfen, Nachfüllen usw.

Abb. 2. a spektrale Extinktion einer *Chlorella*-Suspension in aqua dest. ($4 \cdot 10^7$ Zellen cm^{-2}); b spektrale Energieverteilung einer Leuchtstofflampe HNG.

¹ Das Impfmateriel wurde freundlicherweise von Herrn Prof. A. PIRSON, Marburg, zur Verfügung gestellt.

² Daß das Licht derartiger Fluoreszenzlampen zahlreichen höheren Pflanzen einen vollständigen Vegetationszyklus ermöglicht, haben PIRSCHLE und v. WETTSTEIN bereits 1940 gezeigt. Bei der Kultur von Grünalgen scheint sich das Fluoreszenzlicht jedoch nicht immer bewährt zu haben (SPOEHR u. MILNER, 1949, vgl. dagegen MYERS u. CLARK, 1944; BENSON, 1949, u. a.).

weitere kleine Bohrungen, und zwar unten drei: zwei (B_1 u. B_2) für feine Düsen zur Belüftung und eine (B_3) für ein Thermometer (Th), oben zwei: eine (B_4) zum Luftaustritt und die andere (B_5) zum Einfüllen der Lösung, Impfen oder dergl.

Für größere Kulturen mit 10–20 l Inhalt wurden Standzylinder von 1 m Höhe benutzt, in deren Achse eine Leuchtstofflampe HNG 120 oder HNG 200 angeordnet war. Die elektrischen Anschlüsse waren durch Gummikappen gegen das Eindringen von Wasser geschützt.

Nach dem Zusammensetzen wurden die Kulturgefäße im Dampftopf sterilisiert. Da die Gummistopfen beim Erhitzen auf 100° C unkontrollierbare Stoffe in die Nährlösung abgeben können (MYERS u. CLARK, 1944), wurde die Nährlösung getrennt sterilisiert.

b) Lichtquelle.

Die spektrale Energieverteilung¹ des Lichtes der benutzten Osram-Lampen vom Muster HNG (Niederdruckquecksilberentladungslampen mit Fluoreszenzschicht²) zeigt Kurve b in Abb. 2. Zum Vergleich wurde das Extinktionspektrum von *Chlorella* aus Tageslichtkultur ermittelt (Kurve a). Die leistungsstarken Spektralbezirke der Lampe fallen also gerade in die Bezirke schwächster Lichtabsorption durch die Algen. Obwohl die Algen wahrscheinlich eine geringe Adaptation an die Lichtquelle vornehmen können (vgl. HARDER, 1923; HARDER, SIMONIS u. BODE, 1938; SIMONIS, 1939; BODE, 1941; SAGROMSKY, 1942), darf man wohl annehmen, daß die geringe Übereinstimmung der beiden Spektren recht ungünstig für die Photosynthese und die Entwicklung der Algen ist und daß man mit Lampen, deren spektrale Energieverteilung dem Spektrum der Kurve a ähnlicher ist, bessere Wirkungen bei grünen Pflanzen erzielen würde.

Der Lichtstrom einer Leuchtstofflampe ist von der Temperatur der Umgebung abhängig, d. h. daß in den folgenden Versuchen die Temperatur der Nährlösung auf die Lichtstärke der Lampen einwirkte. Abb. 3 zeigt den Einfluß von Abweichungen von der Kulturtemperatur 25° C auf die Lichtstärke einer Osram-Leuchtstofflampe in einer mit destilliertem Wasser gefüllten 1 Liter-Kulturröhre. — Wegen der gleichmäßigen Beleuchtung aller Zellen siehe Abschnitt „Durchlüftung und Durchmischung“ (f).

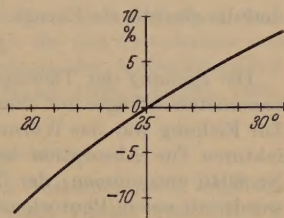


Abb. 3. Abweichung des Lichtstromes einer Osram Leuchtstofflampe HNG 70 im Wasserbad vom Wert für 25° C bei Änderung der Temperatur.

c) Strahlungsmessung.

Zur Messung der Strahlungsleistung³ (Lichtstrom) der Lampe wurden die Kulturgefäße mit den Leuchtstofflampen vor und nach Durchführung eines Versuches nach gründlicher Reinigung mit destilliertem Wasser gefüllt und auf 25° C angewärmt. Bei den 1-Liter- und 1,5-Liter-Gefäßen ragten die Leuchtstofflampen mit ihren lichtschwachen Enden in der Nähe der Elektroden aus dem Kulturgefäß heraus, so daß diese bei der Messung nicht berücksichtigt zu werden brauchten. Die fast gleichmäßige Strahlung des weitaus größten Teils der Lampe, d. h. desjenigen, der mit der Nährlösung in Berührung kommt, wurde an zwölf Stellen —

¹ Für die Genehmigung zur Durchführung dieser Messung im I. Physik. Institut Göttingen, bin ich Herrn Prof. W. POHL sehr zu Dank verpflichtet.

² Die benutzten Leuchtmittel stellte die OSRAM GmbH. KG. zur Verfügung. Ihr sei auch an dieser Stelle unser Dank ausgesprochen.

³ Terminologie nach POHL (1948).

oben, in der Mitte und unten jeweils an vier um 90° auseinander liegenden Punkten — mit einer MOLLschen Thermosäule¹ ausgemessen, der ein 3 mm starkes Schott-sches Glasfilter BG 17 zur Absorption der Wärmestrahlung vorgeschaltet war. Der Abstand der Thermoelemente von der Glasoberfläche betrug 27 mm. Zur Berechnung der in die Kultur eingestrahlten Energie (Lichtmenge) wurde die Beleuchtungsstärke I $\left(\frac{\text{Watt}}{\text{cm}^2}\right)$ direkt gemessen und aus den 24 Werten das arithmetische Mittel gezogen. Für eine Kulturröhre ist die wirksame Strahlungsleistung

$$L_0 = \pi \cdot d \cdot h \cdot I \quad (\text{Watt}),$$

wobei d = Durchmesser der Kulturröhre plus doppelter Abstand der Thermoelemente von der Glasoberfläche der Kulturröhre ist und h = Länge der Lampe, soweit sie von der Kulturlösung bedeckt ist. Zur Berechnung der von der Kultur absorbierten Lichtleistung genügt es dann, jeweils an einer markierten Stelle zu messen. Die Beleuchtungsstärke an dieser Stelle sei vor und nach dem Versuch = I_0 und zur Zeit t des Versuchs = I_t , dann ist die absorbierte Strahlungsleistung

$$L_a = L_0 \cdot \left(1 - \frac{I_t}{I_0}\right) \quad (\text{Watt})$$

und die absorbierte Energie

$$E_a = L_a \cdot t \quad (\text{Wattsekunden}).$$

Die Eichung der Thermosäule und des als Anzeigegerät benutzten Spiegelgalvanometers erfolgte mit einer Hefner-Lampe nach der Vorschrift von POHL (1948). Zur Eichung war das Wärmefilter natürlich nicht eingeschoben. Die Korrekturfaktoren für Absorption und Reflexion des Filters wurden der SCHOTT-Liste Nr. 8040 entnommen; der Transmissionsgrad des Glasmantels der Kulturgefäße wurde mit einem Photoelement ausgemessen².

d) Temperaturregulierung.

Infolge der geringen Wärmeentwicklung der Leuchtstofflampen wurden die Kulturen auch bei Dauerbelichtung nicht wärmer als 35°C . Bei dieser Temperatur sind aber die Optimalbedingungen für die Entwicklung von *Chlorella pyrenoidosa* bereits überschritten. Deshalb wurde zur Kühlung ein feuchtes Tuch außen um den Glaszylinder gelegt und langsam mit Wasser berieselt. Dadurch kam nicht nur eine völlig hinreichende Kühlung zustande, sondern es ergab sich sogar die Möglichkeit, die Temperatur der Nährlösung willkürlich zwischen 17° und 35°C zu verändern.

e) Nährlösung.

Für hohe Substanzproduktion, bei der möglichst keine Mangelerscheinungen auftreten sollten, wurde Nährlösung I angewendet: $1 \cdot 10^{-3} \text{ m KH}_2\text{PO}_4$; $1 \cdot 10^{-3} \text{ m MgSO}_4$; $25 \cdot 10^{-3} \text{ m KNO}_3$; $1 \cdot 10^{-5} \text{ n Fe}$; $0,5 \cdot 10^{-6} \text{ n Mn}$; $\text{pH} = 5,4$. In allen anderen Fällen wurde Nährlösung II (Stickstoffmangelösung) benutzt: $0,3 \cdot 10^{-3} \text{ m KH}_2\text{PO}_4$; $0,5 \cdot 10^{-3} \text{ m MgSO}_4$; $1 \cdot 10^{-5} \text{ n Fe}$; $0,5 \cdot 10^{-6} \text{ n Mn}$; $\text{pH} = 5,4$. Der KNO_3 -Anteil ist bei jedem Versuch besonders angegeben.

Bei rein anorganischen Lösungen führt das photochemisch besonders wirksame Licht der Leuchtstofflampen rasch zur vollständigen Ausfällung des Eisens. Das Eisen wurde deshalb als Citrat zugesetzt (USPENSKI, 1925). Der Zusatz überschüssiger Citronensäure (ROHDE, 1948) ist nicht immer erforderlich. Die im

¹ Von KIPP, Delft.

² Bei der Messung befand sich an beiden Seiten des Glasmantels Luft. Eine Ausmessung unter den Versuchsverhältnissen: innen Wasser, außen Luft, ließ sich aus technischen Gründen nicht durchführen.

Laufe der Arbeit durchgeführten Analysen haben nämlich ergeben, daß bei großer Einsaatdichte der Hauptteil des gelösten Eisens von *Chlorella* in kürzester Zeit aufgenommen wird (Luxusaufnahme, vgl. STEGMANN, 1940; LIEBICH, 1942). Offenbar wird das überschüssige Eisen dann bei der Zellteilung an die Tochterzellen weitergegeben.

f) Durchlüftung und Durchmischung.

In die Nährlösung wurde von unten durch zwei Düsen (B_1 und B_2 , Abb. 1) ein kräftiger Luftstrom geleitet, ungefähr 30–50 l je Std und Kulturgefäß; der Luft waren 5% CO_2 aus einer Bombe¹ beigemischt, die sich bei WARBURG, GELEICK und BRIESE (1951b) als optimale Konzentration erwiesen haben. Die Schwankung in der Mischung betrug $\pm 0,5\%$. Die Luft wurde aus 12 m Höhe über dem Botanischen Garten abgesaugt und mit einer Kolbenpumpe nach Passieren eines Gasmessers und mehrerer Filter mit Glaswolle und Watte von unten in die Kulturen geleitet.

Ungenügende Durchmischung führt zu physikalischen Hemmungserscheinungen des Gasaustausches (DIXON u. ELLIOT, 1930). Vor allem werden aber die Algen durch einen kräftigen Luftstrom so durcheinander gerührt, daß sie alle praktisch die gleiche Lichtmenge erhalten. Schließlich wird durch den Luftstrom auch das Verklumpen der Zellen vermieden; selbst Zellen wie die von *Scenedesmus* und *Ankistrodesmus* blieben bei der kräftigen Durchmischung der Kulturflüssigkeit nach der Zellteilung nicht aneinander hängen (vgl. HAAS, 1932; IGGENA, 1938; WINOKUR, 1948).

g) Bestimmung der Zellenkonzentration.

Die Anzahl der Zellen in den Lösungen wurde durch Auszählen (stets ungefähr 500 Zellen, vgl. MÜLLER, 1923) in der Zählkammer nach THOMA ermittelt. Die Schwankung der Werte war leider recht groß und betrug teilweise mehr als 10%².

Die durchschnittliche Zahl der Tochterzellen, in die sich eine Zelle innerhalb 24 Std teilt, ist nachstehend Vermehrungsfaktor genannt. Er wird durch die Formel

$$f = \sqrt[t]{\frac{c_t}{c_a}}$$

ausgedrückt, wobei c_a und c_t Anfangs- und Endkonzentrationen während des Zeitraums t (Tage) bedeuten. Der Vermehrungsfaktor ist der Zellteilungsfrequenz natürlich nicht proportional. Es ist deshalb unter Umständen anschaulicher, die Generationdauer verschiedener Kulturen zu vergleichen. Sie kann nach der Formel

$$d = t \sqrt[2]{\frac{c_a}{c_t}}$$

berechnet werden. Die Generationdauer d (Tage) ist der Teilungsfrequenz umgekehrt proportional. Diese Beziehung gilt nur, wenn sich die Zellen aus-

¹ Eine Gasanalyse des Inhalts einer Kohlensäureflasche, ausgeführt durch Prof. K. ANDRESS, Erlangen, ergab 0,28–1,14% Verunreinigungen durch Nebengase; sie bestanden fast vollständig aus Stickstoff.

² Um größere Genauigkeit in der Zellenzahlbestimmung zu erreichen, wurde zunächst an photometrische Bestimmung gedacht (PIRSON, 1937; ROHDE, 1948, u. a.); sie mußte aber wegen des unterschiedlichen Farbstoffgehalts der Kulturen (siehe Abb. 11) von vornherein ausscheiden. Leider entsprachen auch Versuche, durch Messung der Beugung eines Lichtstrahls durch die Zellaufschwemmung nach dem Prinzip des Hämacytometers nach LOESCHKE und WEVER (1951) die Zellenzahl zu bestimmen, nicht den an sie geknüpften Erwartungen.

schließlich durch Zweiteilung vermehren. Das trifft für unseren Stamm bei niedrigen Vermehrungsraten auch zu. Abweichend von den Angaben bei PASCHER (1915) teilte sich unsere *Chlorella pyrenoidosa* bei rascher Vermehrung aber auch in vier oder acht Tochterzellen.

3. Chemische Methoden.

a) Chlorophyllbestimmung.

Die Chlorophyllkonzentration wurde im Methanolauszug mit dem PULFRICH-Photometer bestimmt.

b) Lipoidextraktion.

Zur Extraktion wurden die Algen nach dem Abzentrifugieren unter vermindertem Druck bei 40° C im Dunkeln getrocknet. Ungefähr 400 mg der Trockensubstanz, analytisch gewogen, wurden im Porzellanmörser mit Quarzsand gründlich zerrieben und in einer gekürzten Extraktionshülse¹ in den Extraktionsapparat nach HAANEN und BADUM² eingesetzt (vgl. MENKE, 1942). Eine rasche erschöpfende Extraktion kann erreicht werden, wenn abwechselnd Methanol und nicht-wasserlösliche Lösungsmittel angewandt werden. Hierbei werden auch Lipoproteide weitgehend angegriffen (DIRR und v. SODEN, 1942). Deshalb wurde jeweils in der Siedehitze ½ Std mit 25 cm³ 90% igem Methanol, ½ Std mit 20 cm³ absol. Methanol, 1 Std mit 25 cm³ Petroläther, ½ Std mit 20 cm³ absol. Methanol und 1 Std. mit 30 cm³ Äther extrahiert. Dann ist die Extraktion praktisch beendet. Zur Kontrolle wurde stets noch weitere 16 Std extrahiert.

Der Rohextrakt wurde im CO₂-Strom eingeengt und im Dunkeln unter vermindertem Druck bei ungefähr 40° C getrocknet. Der Rückstand wurde mit Petroläther/Benzol 14:1 aufgenommen und in einen vorgewogenen Kolben filtriert. Nach Vertreibung der Lösungsmittel wurde das Gewicht des Extraktes festgestellt. Das so erhaltene Gemisch stellt die Substanz dar, die nachstehend als Lipoid bezeichnet wird. Bis zur weiteren Fraktionierung, die innerhalb der nächsten drei Tage erfolgte, wurde sie in CO₂-Atmosphäre bei +2° C im Dunkeln aufgehoben.

c) Lipoidanalyse.

Die Trennung der Lipoiden wurde durch Adsorption und fraktionierte Elution an einer Saccharose- und einer Aluminiumoxydsäule vorgenommen. Bei dieser Methode, die von KATHEN (1949) auf Grund der vorhergehenden Versuche von TRAPPE (1940) entwickelt wurde, werden die Lipoiden ohne vorherige Verseifung getrennt (DEUTICKE, HARDER, KATHEN 1949).

Für die Adsorption wurden die Lipoiden mit Petroläther/Benzol 14:1 aufgenommen. Damit dabei kein unlöslicher Rückstand übrig blieb, war dieses Lösungsmittelgemisch bereits bei der Abtrennung der Lipoiden von den übrigen Extraktstoffen angewendet worden. Dabei wurden nicht ganz soviel Stoffe erfaßt, wie durch den sonst üblichen Äther. Im Modellversuch blieb auch Sphingomyelin³ zumindest teilweise ungelöst. Da sich andere phosphorsäurehaltige Lipoiden ähnlich verhalten, ist damit zu rechnen, daß von den extrahierten Phospholipiden nur ein Teil adsorbiert wurde. Die Phosphatbestimmung erfolgte photometrisch nach LOHMANN und JENDRASSIK (1927). — Alle zur Extraktion und Adsorption verwendeten Lösungsmittel wurden kurz vor Gebrauch gründlich gereinigt.

¹ Von SCHLEICHER und SCHÜLL Nr. 603.

² Von SCHOTT und Genossen.

³ Für die Überlassung des Präparates sei Herrn Prof. KLENCK, Bonn, auch an dieser Stelle gedankt.

d) Eiweißbestimmung.

Zur Berechnung des Eiweißgehaltes wurde die Differenz aus Gesamtstickstoff — löslicher Stickstoff mit dem Faktor 6,25 multipliziert. Dabei wird der unlösliche Lipoidstickstoff als Eiweiß mitberechnet.

Die Bestimmung des Gesamtstickstoffs wurde nach der KJELDAHL-Methode durchgeführt. Zur Veraschung einer abgewogenen Menge getrockneter Algen (10—15 mg) wurden der Schwefelsäure einige Tropfen Wasserstoffperoxyd zugesetzt. Als Katalysator diente Selenreaktionsgemisch nach WIENINGER. Nach der Destillation in eine Vorlage mit 2%iger Borsäure und Mischindicator nach MA und ZUAZAGA (1942) wurde mit n/70 Salzsäure titriert.

Die Schwierigkeiten bei der Bestimmung des löslichen Stickstoffs in der *Chlorella*-Substanz sind von ALBERTS-DIETERT (1941) diskutiert worden. Nach eingehenden Versuchen erwies sich die von SCHENCK angegebene Methode für unsere Analyse geeignet. 200 mg *Chlorella*-Trockensubstanz wurden mit Quarzsand im Porzellanmörser gründlich zerrieben. Das staubfeine Pulver wurde unter Zusatz

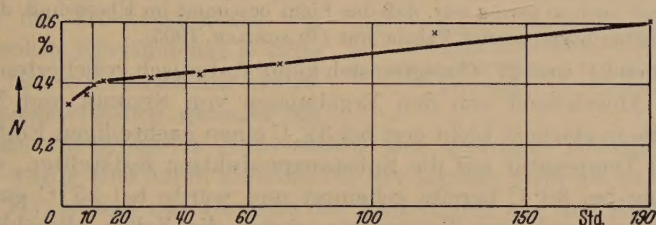


Abb. 4. Abhängigkeit des gefundenen löslichen KJELDAHL-Stickstoffs von der Zeit der Einwirkung des Fällungsmittels.

von gleichen Teilen 1,2 n Salzsäure und 5%iger Sublimatlösung 40 Std im Kühlschrank aufgehoben. Während dieser Zeit wurde das Gemisch häufig gut durchgeschüttelt. Dann wurde filtriert, im Filtrat die überschüssigen Quecksilberionen durch Schwefelwasserstoff gefällt und aus dem klaren Filtrat der Schwefelwasserstoff durch Einleiten von Luft entfernt. Um ein vollkommen klares Filtrat zu erhalten, mußte die Eiweißfällung unter Umständen wiederholt werden. Im aliquoten Teil der Lösung wurde der Stickstoffgehalt wie oben beschrieben bestimmt. — Die auf diese Weise erhaltenen Werte sind etwas von der Extraktionsdauer abhängig (Abb. 4).

e) Nitratbestimmung.

Der Nitratgehalt wurde in der klaren Kulturlösung nach Vertreibung der Kohlensäure durch Reduktion mit DEVARDAScher Legierung und Natronlauge bestimmt. In der Vorlage befand sich n/100 Schwefelsäure, die mit n/100 Natronlauge unter Verwendung des Mischindicators nach TASHIRO (Methylrot + Methylenblau) zurücktitriert wurde.

f) Aschebestimmung.

10—20 mg Trockensubstanz wurden im Mikroplatin Schiffchen im elektrischen Ofen bei höchstens 700° C verbrannt.

g) Eisenbestimmung.

100 mg *Chlorella*-Trockensubstanz wurden durch Kochen mit konzentrierter Schwefelsäure unter Zusatz von Salpetersäure und 30%igem Wasserstoffperoxyd

verascht. Die mit Ammoniumrhodanid auftretende Rotfärbung wurde im Stufenphotometer gegen den Leerwert ausgemessen (vgl. SEYBOLD und Mitarb., 1950). Die Eichkurve wurde durch Photometrierung einer Verdünnungsreihe einer Eisenaunlösung unter den gleichen Bedingungen erhalten.

II. Ergebnisse.

A. *Chlorella pyrenoidosa*.

1. Der Einfluß der Temperatur auf die Zellenvermehrung.

Die Zellteilung von *Chlorella pyrenoidosa* wurde zwischen 17° und 35° C untersucht. Dazu wurden 16 1-Liter-Röhren benutzt, von denen je zwei die gleiche Temperatur hatten. Es war nicht zu vermeiden, daß die Lichtleistung in den verschieden temperierten Röhren unterschiedlich war, weil die Temperatur der Nährlösung die Lichtemission der Leuchtstofflampen beeinflußt (Abb. 3). Zum Vergleich wurde deshalb nur das Wachstum während der ersten 5 Tage benutzt, solange die Zelldichte noch so gering war, daß das Licht bestimmt im Überschuß, d. h. kein das Wachstum begrenzender Faktor war (BLACKMAN, 1905).

Zwischen 21° und 27° C zeigten sich keine statistisch gesicherten Unterschiede. Abweichend von den Ergebnissen von SPOEHR und MILNER (1949), die in starkem Licht erst bei 35° C einen nachteiligen Einfluß der erhöhten Temperatur auf die Substanzproduktion feststellten, war die Zellteilung bei 30° C bereits gehemmt und wurde bei 35° C ganz eingestellt. Bei der hohen Temperatur gingen die Zellen allmählich zugrunde; bei kurzfristiger Temperaturerhöhung auf 35° C waren allerdings Nachteile nicht nachweisbar. Unter 20° C war die Zellteilung verlangsamt¹.

2. Einfluß des Stickstoffgehalts der Nährlösung auf Zellteilung und Substanzbildung.

Vier Gruppen von Kulturen (A, B, C, D) wurden in 1-Liter-Röhren mit Nährlösung II angesetzt. In den Kulturen A betrug die Stickstoffkonzentration als KNO_3 $1,26 \cdot 10^{-3}$ n. Die Stickstoffgaben der übrigen Kulturen verhielten sich dazu wie 2 : 4 : 6. Durch entsprechende Kaliumchloridzusätze wurde der Kaliumgehalt ausgeglichen und in sämtlichen Kulturen auf $10,3 \cdot 10^{-3}$ n gebracht (Tab. 1, Zeile 2). Die Impfkonzentration betrug 50 Zellen je mm^3 , die dauernd eingestrahlte Lichtleistung bei 25° C 2 Watt; die Unterschiede in der Lichtleistung der einzelnen Lampen waren nicht größer als 10%.

Nach zwölf Tagen war in sämtlichen Kulturlösungen kein Nitrat mehr nachweisbar. Von dem ursprünglichen Nitratstickstoff konnten nach 16 Tagen in der Zellsubstanz 81—85% als Gesamtstickstoff (nach KJELDAHL bestimmt, also reduzierter Stickstoff) wiedergefunden werden

¹ Bei 17° C traten offenbar bei der Teilung Hemmungen ein, denn es entstanden in großer Zahl sonderbare Doppelzellen. Vielleicht sind es solche Stadien gewesen, die WEISS (1950) dazu veranlaßten, die Möglichkeit von Kopulationen bei vegetativen *Chlorella*-Zellen zu diskutieren.

(Tab. 1, Zeile 7). Dabei war in den Kulturen mit dem ursprünglich niedrigsten Nitratgehalt der Prozentsatz reduzierten Stickstoffs am höchsten. Die Menge der gebildeten Trockensubstanz stieg zwar mit dem Stickstoffgehalt der Nährlösung an, aber nicht im gleichen Maße; sie war relativ um so geringer, je mehr Nitrat die Nährlösung enthalten hatte (Abb. 5). Dafür erhöhte sich der Anteil des reduzierten Stickstoffs an der Trockensubstanz (Tab. 1, Zeile 6). Sowohl der prozentuale Eiweißgehalt der Trockensubstanz wie die absolute Eiweißmenge je Zelle waren in den Kulturen mit niedrigen Stickstoffgaben geringer als in denen mit größerem Nitratzusatz. Der niedrigere Eiweißgehalt der Zellen wurde aber durch Vermehrung der Lipide mehr als wettgemacht (Zeile 11), so daß das Gewicht der Einzelzellen aus den Kulturen mit dem geringsten Nitratzusatz am größten war (Zeile 5).

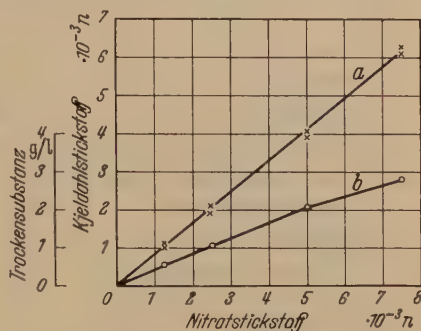


Abb. 5. *Chlorella pyrenoidosa*. a Gesamtstickstoff nach KJELDAHL in der Kultur; b Trockengewicht der organischen Substanz in Abhängigkeit vom NO_3 -Gehalt der Nährlösung.

Tabelle 1. *Chlorella pyrenoidosa*. Einfluß des Nitratgehaltes der Nährlösung auf Zellenzahl, Substanzmenge und chemische Zusammensetzung. Nitratverhältnis in den Kulturen A, B, C, D wie 1 : 2 : 4 : 6. Ernte nach 16 Tagen Kultur im Dauerlicht; Lichtleistung je Kultur 2 Watt $\pm 10\%$.

Nr.		Kulturgruppe			
		A	B	C	D
1	Nährlösung II, KNO_3 10^{-3} m .	1,26	2,5	5,0	7,5
2	„ „ KCl 10^{-3} m . .	8,74	7,5	5,0	2,5
3	Zellenzahl je 10^{-5} cm ³	1075	1920	3230	3820
4	Trockensubstanz je Liter, mg. .	833	1450	2414	2841
5	Trockengewicht 1 Zelle, 10^{-12} g.	7,75	7,54	7,47	7,44
6	Gesamt-KJELDAHL-Stickstoff in Prozent d. Trockensubstanz	1,78	2,03	2,35	3,04
7	in Prozent d. Nitratstickstoffs	84,5	83,8	81,3	80,9
8	Löslicher Stickstoff, Prozent d. Trockensubstanz	0,13	0,14	0,16	0,20
9	Eiweiß, Prozent d. Trocken- substanz	10,6	11,8	13,7	17,8
10	Eiweißgehalt je Zelle, 10^{-12} g. .	0,82	0,89	1,02	1,32
11	Lipide, Prozent d. Trocken- substanz	65,1	61,8	56,3	37,2

Tabelle 2. *Chlorella pyrenoidosa*. Parallelkulturen zu den in Tab. 1 aufgeführten. Ernte etwa zur Zeit des Aufhörens der Zellenvermehrung. (D zu früh geerntet.)

Nr.		Kulturgruppe			
		A	B	C	D
1	Alter (Tage)	7,7	9,0	11,0	12,7
2	Zellenzahl je 10^{-5} cm ³	1080	2075	3325	3430
3	Trockensubstanz je Liter, mg	587	1085	2110	2230
4	KJELDAHL-Stickstoff, Prozent d. Trockensubstanz	2,59	2,64	2,65	3,81
5	Löslicher Stickstoff, Prozent d. Trockensubstanz	0,24	0,20	0,19	0,21
6	Eiweiß, Prozent d. Trockensubstanz	14,7	15,5	15,8	22,5
7	Lipide, Prozent d. Trockensubstanz	36,5	39,8	40,6	34,2

Die in Tab. 2 aufgeführten Analysendaten stammen aus Parallelkulturen zu den eben besprochenen. Sie wurden jedoch nicht zur gleichen Zeit geerntet, sondern möglichst in dem Zeitpunkt, in dem die Zellenvermehrung in den Kulturen eingestellt wurde. Durch tägliche Kontrolle der Zellenzahl kann dieser Zeitpunkt ungefähr ermittelt werden. Die Daten für Eiweiß- und Lipidgehalt der Kulturen A—C liegen verhältnismäßig dicht beieinander, die für D fallen etwas aus der Reihe; offenbar wurde diese Kultur zu früh abgebrochen, denn der Stickstoffgehalt der Trockensubstanz war noch erheblich höher als in den Kulturen A—C. Aus der Zellenzahl der nach 16 Tagen geernteten Parallelkultur (Tab. 1) ist zu ersehen, daß sich die Zellen noch weiter geteilt hatten.

3. Wirkung des Lichtes auf Vermehrung und Substanzzusammensetzung der Zellen.

a) Rhythmische Belichtung.

VON DENFFER (1948) hat bei *Nitzschia palea* und GERDES (1951) bei *Scenedesmus* gefunden, daß sich den Algen bei regelmäßigem Licht-Dunkel-Wechsel ein Rhythmus aufprägt, der sich im Zeitpunkt der Zellteilungen zu erkennen gibt. Und

Tabelle 3. *Chlorella pyrenoidosa*. Zellenvermehrung im Verlaufe eines Tages in einer Kultur mit täglich 16stündiger Belichtung.

Kulturtag	Uhrzeit	Belichtung	Zellen in 10^{-5} cm ³
5.	08.30	hell	472
	12.00	Beginn der Verdunklung	
	16.30	dunkel	480
	20.00	Ende der Verdunklung	484
	23.30	hell	1230
6.	10.00	hell	1350

zwar fanden die Zellteilungen simultan je nach Art des Beleuchtungsrhythmus entweder im Anschluß an die Belichtung oder auch zu anderen Zeiten statt. Bei *Chlorella pyrenoidosa* dürften die gleichen Verhältnisse vorliegen; denn die im Verlaufe von 24 Std erhaltenen Zellenzahlen aus einer Kultur, die täglich 16 Std belichtet und 8 Std verdunkelt wurde, zeigten einen sprunghaften Anstieg nach Einsetzen der Belichtung (Tab. 3).

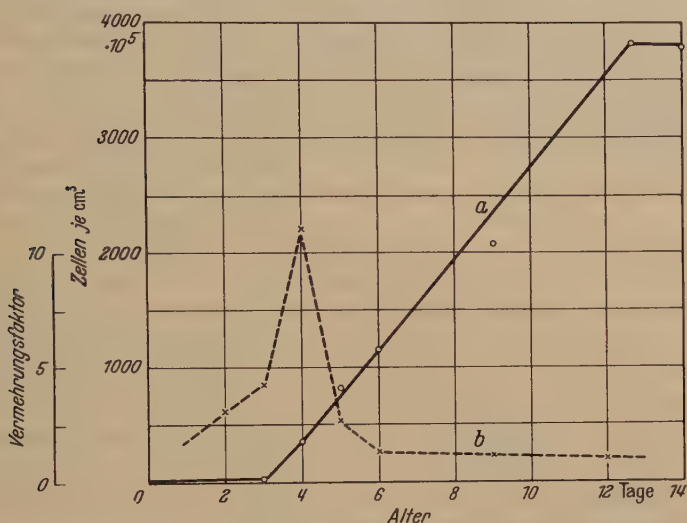


Abb. 6. *Chlorella pyrenoidosa*. Kultur im Dauerlicht; Lichtleistung 2 Watt. 1 l Nährlösung.
a) Zellenzahl je 10^{-5} cm³, b) Vermehrungsfaktor.

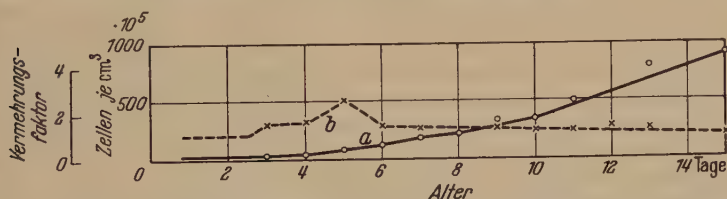


Abb. 7. *Chlorella pyrenoidosa*. Kultur im Dauerlicht; Lichtleistung 3 Watt. 18 l Nährlösung.
a) Zellenzahl je 10^{-5} cm³, b) Vermehrungsfaktor.

b) Dauerlicht.

Bei konstanter Beleuchtung war in unseren Versuchen aber kein Rhythmus der Zellteilung zu erkennen. Die Teilungen waren gleichmäßig über die 24 Std eines Tages verteilt, und die Zellenzahl stieg stetig an (Abb. 6 u. 7).

Die Kurven der Abb. 6 stammen aus einer 1-Literkultur mit ungefähr 2 Watt Lichtleistung, die der Abb. 7 aus einer 18-Literkultur mit 3 Watt Lichtleistung. Der Unterschied im Verlauf der beiden Zellenzahlkurven ist auffällig. Einem starken Anstieg auf fast 4000 Zellen je 10^{-5} cm³ in Abb. 6 steht im gleichen Zeitraum in Abb. 7 ein viel geringerer auf nur 800 Zellen gegenüber. Die Diskrepanz beruht auf der Tatsache, daß die Zellenkonzentration — wie allgemein üblich —

auf die Volumeneinheit Kulturflüssigkeit bezogen wurde. Das ist bequem, weil auch Nährstoffe, Trockengewicht und oft sogar der Zuwachs u. ä. auf die Volumeneinheit bezogen werden. Alle diese Größen lassen sich auch gleichmäßig auf den Raum verteilen, aber das Licht kann wegen seiner im LAMBERT-BEERSchen Gesetz formulierten Exponentialfunktion der Absorption nicht auf Volumeneinheiten bezogen werden. Man kann die Beleuchtungsstärke, die als Strahlungseinheit/Flächeneinheit definiert ist, benutzen, um zu allgemeingültigen Formulierungen der Lichtwirkung auf die Pflanzen zu gelangen. Dann müssen natürlich auch die Vergleichswerte auf Flächeneinheiten bezogen werden. Das ist auch schon bei vielen Ergebnissen, die von der Lichtwirkung abhängen, durchgeführt worden (Assimilationsleistung z. B. von BROWN und ESCOMB, 1903, Farbstoffe z. B. von SEYBOLD und EGGLE, 1938, Trockensubstanzbildung z. B. von HEATH und GREGORY,

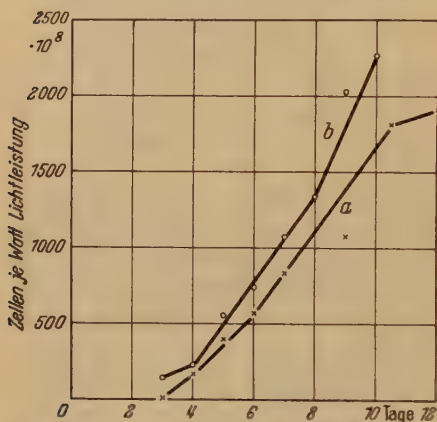


Abb. 8. *Chlorella pyrenoidosa*. Kultur im Dauerlicht; Zellenzahlen je Watt Lichtleistung. a) 11 Nährlösung, 2 Watt. b) 18 l Nährlösung, 3 Watt.

1938, und von SIMONIS, 1947). MYERS, PHILLIPS und GRAHAM (1951) haben auch den Zuwachs in ihren *Chlorella*-kulturen auf die Oberfläche der Kulturgefäße bezogen, allerdings ohne den Versuch zu machen, die Beleuchtungsstärke zu messen. Um diese nicht mehr biologische und wenig anschauliche Konsequenz zu vermeiden, sollte das Licht gemessen und die Einheit der Strahlungsleistung zur Grundlage des Bezugssystems gemacht werden. Die Volumeneinheit ist dann selbstverständlich ohne jede Bedeutung. — Wenn hier trotzdem die Volumeneinheit als Bezugsgröße beibehalten worden ist, so nur um den Vergleich der Ergebnisse mit denen anderer Arbeiten nicht unmöglich zu machen. Die Ergebnisse sollen hier aber gleichzeitig auch auf

Strahlungsleistung und absorbierte Energie bezogen werden. Da es seit der Untersuchung von WARBURG und NEGELEIN (1923) bekannt ist, daß nicht die absorbierte Energie, sondern die Zahl absorbierter Quanten für die Lichtwirkung auf die Pflanzen von Bedeutung ist, ist auch diese Größe bei den nachfolgenden Untersuchungen nach Möglichkeit angegeben worden.

Zum Abschluß dieser Überlegungen sollen die Zellenzahlen, die in den Abb. 6 und 7 auf die Volumeneinheit bezogen sind, auf die eingestrahlte Leistung bezogen werden (Abb. 8). Der Verlauf der beiden Zellenzahlkurven zeigt nun eine weit bessere Übereinstimmung.

Die geringere Steigung der 1-Literkultur kann durch die Tatsache erklärt werden, daß die (auf die Volumeneinheit bezogen gleiche) NO_3^- -Menge (Nährlösung I) in dieser Kultur absolut fast nur 1/20 der NO_3^- -Menge in der größeren Kulturröhre betrug; der assimilierbare Stickstoff war in der 1-Literöhre am 11. Tag erschöpft.

Bevor mit der Darstellung der Versuche, die Wirkung unterschiedlicher Lichtleistung quantitativ zu erfassen, begonnen wird, müssen hier nochmals einige theoretische Erörterungen eingeschaltet werden. — Die mantelförmige Anordnung des Kulturmediums um die Lichtquelle (Abb. 1) ermöglicht eine bequeme Messung sowohl der eingestrahlten, als auch der absorbierten Lichtleistung

(siehe Kap. I, 2c). Die Kulturen lassen sich aber leicht bis zu einer solchen Dichte heranziehen, daß der noch heraustretende Teil des Lichtes vernachlässigt werden kann. Das herausfallende Licht ist bei mittlerer Zellkonzentration hellgrün gefärbt; mit steigender Zelldichte wird die grüne Farbe immer dunkler, um schließlich zu einem grau gefärbten Lichtschimmer zu werden. Läßt man die Zelldichte dann noch weiter ansteigen, so erscheint das von innen erleuchtete Kulturgefäß im völlig verdunkelten Zimmer schwach, aber deutlich rot. Da die Lichtemission der Leuchtstofflampe oberhalb $700\text{ m}\mu$ praktisch Null ist, muß es sich in erster Linie um Fluoreszenzlicht der Chromatophoren handeln. Infolge der geringen Lichtabsorption der Algen in diesem langwelligen Spektralbereich (Abb. 2a) kann dieses Licht auch bei großer Zelldichte noch nach außen treten. Zur Erklärung des fahlen Lichtes in der Zeit des Übergangs von grüner zu roter Färbung muß man annehmen, daß zu dieser Zeit das grüne und das rote Licht ungefähr energiegleich waren; da die beiden Farben einander komplementär sind, resultiert ein grauer Lichteindruck.

Um einen bestimmten physiologischen Zustand der Algen definierten Kulturbedingungen zuordnen zu können, wären eigentlich Kulturbedingungen nötig, bei denen völlige Konstanz der Zellenzahl in der Lösung herrschte. Das wäre z. B. in strömender Nährlösung möglich, wobei der Zustrom frischer Nährlösung so geregelt sein müßte, daß der laufende Neuzuwachs an Zellen von der abströmenden Kulturlösung mitgenommen würde, so daß im Gefäß eine konstante Zahl an Zellen erhalten bliebe¹. Leider fehlten die Mittel, um eine für die Versuche dieser Arbeit erforderliche Anzahl solcher Kulturanlagen einzurichten. Deshalb wurde nicht mit einem kontinuierlichen Lösungsstrom gearbeitet, sondern in jeweils gleichen Abständen wurden gleich große Mengen der Kulturflüssigkeit entnommen und durch frische Nährlösung ersetzt.

Die Größe des Zeitabstandes und der Entnahmemenge sind selbstverständlich von außerordentlicher Bedeutung für die Konstanz der Kulturverhältnisse. Entnimmt man in zu kurzen Abständen oder zu große Mengen, so nimmt die Zellkonzentration natürlich ab, bei zu langen Abständen oder zu geringen Entnahmen wird die Zelldichte größer. Bei abnehmender Zellkonzentration wird naturgemäß die auf die Einzelzelle entfallende Lichtmenge im Laufe der Zeit größer und damit steigt — wie die Versuche unten noch zeigen werden — die Teilungsfrequenz. Bei zunehmender Zellkonzentration infolge zu geringer Entnahmen tritt dagegen der umgekehrte Vorgang ein: Die Teilungsfrequenz wird herabgesetzt. Deshalb nähern sich die Kulturverhältnisse in beiden Fällen einem Gleichgewicht, das zwar nicht einen stationären Zustand darstellt, bei dem aber ein bestimmter Zeitabschnitt einer Kultur stets wiederholt wird. Nach der Erreichung des Gleichgewichtes ist die Entnahmemenge an Algen gleich der Menge des Zuwachses zwischen zwei Entnahmen. Die in der Zeit zwischen zwei Entnahmen absorbierte Energie ist dann gleich der Energiemenge, die für den Zuwachs aufgewandt wurde.

¹ Eine ähnliche sogenannte kontinuierliche Methode ist von MYERS und CLARK (1944) beschrieben worden. Exakte Lichtmessungen vorausgesetzt, dürfte es nach deren Arbeitsweise möglich sein, Strahlungsleistung und Absorption der Einzelzelle zu ermitteln; dagegen dürfte die Berechnung der absorbierten Energie (Lichtmenge) auf Schwierigkeiten stoßen.

Die Ergebnisse und Analysendaten sind in Tab. 4 zusammengestellt. Aus den Formeln zur Berechnung des Vermehrungsfaktors und der Generationsdauer (Kap. I, 2g) geht hervor, daß diese Größen nur von dem Verhältnis von Anfang- und Endkonzentration der Zellen bestimmt werden. Die Erreichung konstanter Zellenzahlen in der Kultur vorausgesetzt, sind sie von der absoluten Zellenkonzentration unabhängig. Sind Entnahmezeiten und -mengen einmal festgesetzt, so ist damit auch der Vermehrungsfaktor und die Generationsdauer festgelegt. Sie stellen also keine experimentellen Befunde dar, sondern werden durch die Einstellung des Gleichgewichts nur bestätigt. Dagegen stellt die absolute Zellenzahl und damit auch die auf die Einzelzelle entfallende Strahlungsleistung und -energie ein Ergebnis der Versuchsanstellung dar. In der Tabelle sind jedoch die Leistungswerte, die den physiologischen Zustand der Algen bedingen (Zeile 7), vor den Werten über Vermehrung und Substanzzusammensetzung aufgeführt, die den physiologischen Zustand charakterisieren sollen (Zeilen 8—12). Auch im folgenden Text ist diese biologische Kausalität vorausgesetzt.

Die Trockensubstanzbildung je Energieeinheit (Zeile 5) war in stärkerem Licht geringer als bei schwächerer Beleuchtung. Sie nahm bei Versechsfachung der Beleuchtung um die Hälfte ab. Die absoluten Erntemengen (Zeile 4) nahmen aber bei Verstärkung der Beleuchtung erheblich zu und betrugen in Kultur H₁ 0,34 g je Tag¹. Den größeren Erntemengen entsprachen die durch die Verstärkung des Lichtes ermöglichten höheren Zellendichten (Zeile 6). An der größeren Zellenkonzentration lag es auch, daß der auf die Einzelzelle entfallende Anteil des eingestrahltten Lichtes (Zeile 7) nicht ganz so stark anstieg, wie dessen absolute Werte (Zeile 2). Die Steigerung des Gehaltes an reduziertem Stickstoff (Zeile 10) mit wachsender Lichtleistung war aber trotzdem zu erkennen. Zwar sind die Unterschiede zwischen den Kulturen F und G nicht signifikant, da aber den in der Tabelle angegebenen Werten gut übereinstimmende Doppelbestimmungen zugrunde liegen, ist der Anstieg des Stickstoffgehaltes in der ganzen Versuchsreihe (also von E bis H) sehr gut gesichert. Wenn der Unterschied zwischen dem Anfangs- und dem Endwert dieser Reihe nur knapp 1% beträgt, so bedeutet das aber bereits eine deutliche Verschiebung in der Zusammensetzung der organischen Substanz, da der Stickstoff ja nur einen kleinen Teil der durch ihn charakterisierten Verbindungen ausmacht. Der Prozentsatz löslichen Stickstoffs an der Trockensubstanz (Zeile 11) war bei stärkerem Licht ebenfalls erhöht. Dies darf man wohl ohne weiteres mit den verstärkten Synthesen in Zusammenhang bringen, die in der mit der Lichtverstärkung erhöhten Substanzproduktion (Zeile 4) ihren Niederschlag

¹ Aus einer 10-Liter-Kulturröhre mit 7 Watt Lichtleistung konnten unter ähnlichen Bedingungen täglich 1,1 g Trockensubstanz geerntet werden.

finden. Um die raschere Teilungsfolge anschaulicher als durch den Vermehrungsfaktor (Zeile 8) zu kennzeichnen, ist auch die durchschnittliche Generationsdauer (Zeile 9) in die Tabelle aufgenommen. — Über-raschenderweise war der Lipoidgehalt (Zeile 12) von der Strahlungsleistung weitgehend unabhängig.

Setzt man für die großen Gruppen der organischen Substanz, Kohlenhydrate¹, Fette und Eiweiß, die bekannten Verbrennungswärmen ein (aus REIN 1948), so kann man den Energieinhalt der Algen angenähert berechnen. Es enthielten demnach z. B. 100 g *Chlorella*-Trockensubstanz (E_1):

	Calorien	
	je mg	insgesamt
5,7 mg Asche	—	—
22,3 mg Lipoide	9,5	212
($6,25 \times 6,35$ mg red. Stickstoff) =		
39,7 mg N-Verbindungen	5,5	218
32,3 mg Kohlenhydrate	4,1	130

100,0 mg Trockensubstanz enthalten 560 cal = 2345 Wattsec.

Diese Energiemenge, ausgedrückt in Prozent der zur Bildung der Algensubstanz aufgewandten Energie, bezeichnen wir als Lichtausnutzung. Sie betrug in den Kulturen E 6% und H 3%, war also bei den Kulturen im schwachen Licht günstiger als bei stärkerer Beleuchtung (Tab. 5). Da die spektrale Zusammensetzung des Lichtes der benutzten

Tabelle 5. *Chlorella pyrenoidosa*. Lichtausnutzung und Quantenverbrauch bei geringer Lichtabsorption der Einzelzelle ($1,4-5,6 \times 10^{-12}$ Watt).

	E_1	E_2	F_1	F_2	G_1	G_2	H_1	H_2
Je Zelle absorbierte Leistung, 10^{-12} Watt	1,4	1,5	2,8	2,6	4,4	4,3	5,4	5,6
Lichtausnutzung in Prozent	6,03	6,0	4,1	4,05	3,9	3,6	3,1	3,1
Quantenverbrauch je Zellteilung, 10^{12} . .	6,81	7,29	9,5	8,83	10,7	10,5	10,1	10,5
Quantenverbrauch je C-Atom (s. Text) .	45		66		70		88	

Leuchtstofflampen bekannt ist (Abb. 2b), ist auch die Zahl der Lichtquanten je Energieeinheit zugänglich. Die Zahl der in der organischen Substanz enthaltenen C-Atome wurde durch Elementaranalyse ermittelt², so daß wir auch die Zahl absorbierter Quanten angeben können, die

¹ Der Gehalt an Kohlenhydraten ist berechnet nach

Prozent KH = $100 - (6,25 \times \text{Prozent N} + \text{Prozent Lipoide} + \text{Prozent Asche})$.

Die auf diese Weise erhaltenen Werte stellen natürlich nur Näherungswerte dar.

² Ausgeführt durch Dr. W. STUCK, Berlin-Steglitz.

zum Aufbau der auf ein Kohlenstoffatom entfallenden organischen Substanz verbraucht wurden. Dieser Quantenverbrauch stieg in der Versuchsanordnung von 45 (E_1) auf 88 (H_1), obwohl der in diesen Werten enthaltene Anteil, der nur zur Erhaltung des Lebens der Zellen aufgewandt werden mußte¹, bei den Kulturen in schwächerem Licht, E, größer war, als bei denen mit stärkerer Beleuchtung. Die Quantenwerte sind der Lichtausnutzung fast umgekehrt proportional, da sich der Kohlenstoffgehalt von E (47,93% der Trockensubstanz) bis H (48,56% der Trockensubstanz) nur um 0,6% erhöhte. Auch die für die Zerteilung einer Zelle erforderliche Zahl absorbierter Quanten erhöhte sich bei Verstärkung der Beleuchtung; sie stieg von etwa $7 \cdot 10^{12}$ in E auf $1 \cdot 10^{13}$ in H.

β) Starklichtkulturen.

Obwohl in den Kulturen der vorbeschriebenen Versuche die Lichtleistung erheblich variiert wurde, muß man die Algen darin nach der ökologischen Terminologie sämtlich zu den Schwachlichtformen rechnen. Die Kurve *a* in Abb. 9 veranschaulicht den Abfall der Beleuchtungsintensität in einer Schwachlichtkultur in radialer Richtung. Durch die starke Bewegung in der durchlüfteten Lösung schwankten die Algen zwischen dem relativ kleinen Innenraum mit Beleuchtungsstärken bis zu $50 \cdot 10^{-4}$ Watt \cdot cm⁻² in der Nähe der Lampe und den dunklen Außenbezirken ständig hin und her. Sind die Kulturröhren frisch beimpft, so fehlen ihnen infolge der geringen Zelldichte natürlich die dunklen Bezirke am Außenrande der Röhren (Abb. 9b). Ein Teil des Lichtes tritt daher nicht-absorbiert nach außen durch. In solchen Kulturen entfällt auf die Einzelzelle im Durchschnitt $50 \cdot 10^{-12}$ Watt und mehr an absorbierter Leistung gegenüber $1,5$ bis $6 \cdot 10^{-12}$ Watt in den Schwachlichtkulturen (Tab. 5).

Um Starklichtkulturen zu erhalten, wurde nicht wie bei den vorhergehenden Versuchen nur

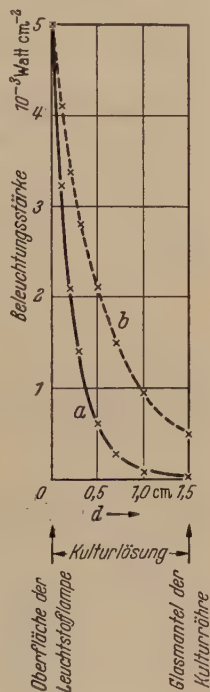


Abb. 9.

Abb. 9. *Chlorella pyrenoidosa*. Abfall der Beleuchtungsstärke in den Kulturröhren mit zunehmendem Abstand von der Lampe (0–1,5 cm). *a*) in einer Schwachlichtkultur, *b*) in einer Starklichtkultur.

Berechnet nach der Formel: $I_d = I_r \frac{r^2}{(r+d)^2} \cdot e^{-\beta d}$ (Watt cm⁻²).

Es bedeuten: $I_r = I_{d0}$ = Leuchtdichte der Lampe; I_d = Beleuchtungsstärke in der Entfernung d cm von der Oberfläche der Lampe; r = $\frac{1}{2}$ Durchmesser der Leuchtstofflampe; e = Basis der natürlichen Logarithmen; β = Extinktionskoeffizient; d = Entfernung von der Oberfläche der Lampe (cm).

¹ Diese Energie ist nicht ohne weiteres der in der Atmung freigesetzten Energie gleichzusetzen.

$\frac{1}{4}$, sondern $\frac{3}{4}$ der Kulturflüssigkeit abgelassen und durch frische Nährlösung I ersetzt. Das geschah, nachdem die frisch beimpften Kulturen sich zunächst vier Tage lang ungehindert vermehrt hatten. Die Zellenzahl betrug jetzt $3950 \text{ je } 10^{-5} \text{ cm}^3$. Der Ersatz der Lösung wurde an zehn aufeinander folgenden Tagen täglich vorgenommen. Dadurch sollte sich ein Gleichgewicht einstellen, bei dem sich die Zellen täglich in vier Tochterzellen teilten. Nach zwei Tagen schien dieser Zustand in den beiden angesetzten Kulturen, S_1 und S_2 , bereits erreicht zu sein. Der Vermehrungsfaktor schwankte in den folgenden Tagen noch etwas. Vom siebten Tag (Beginn der Auswertung) bis zum 14. Tag (Ende des Versuchs) sank die Zellenzahl unter den angegebenen Bedingungen von 375 auf 215 Zellen je 10^{-5} cm^3 . Der Vermehrungsfaktor 4 ließ sich also nicht ganz aufrechterhalten; im Mittel teilten sich die Zellen täglich in 3,6 Tochterzellen.

Die Berechnung der absorbierten Lichtmenge stieß auf gewisse Schwierigkeiten, da bei der täglich vorgenommenen 75% igen Erneuerung der Kulturflüssigkeit die Zelldichten und damit auch die Lichtabsorption vor und nach dem Lösungswechsel großen Schwankungen unterlagen, wie aus Tab. 6 ersichtlich ist. Die Lichtausnutzung läßt sich mit guter Annäherung als etwa 6% angeben, wobei die Erntemenge eines Tages zu

Tabelle 6. *Chlorella pyrenoidosa*. Eingestrahle Lichtleistung und Absorption in Starklichtkulturen.

Nr.	Kulturgruppe	S_1		S_2	
1	Strahlungsleistung, Watt	1,84		1,69	
		nach	zur Zeit	nach	zur Zeit
		der Entnahme		der Entnahme	
2	Am 7. { Zellenkonz. je 10^{-5} cm^3 . . .	100	400	90	360
3	Kultur- { Lichtabsorption, Prozent . .	50	75	44	71
4	tag { je Zelle absorbiert, 10^{-12} Watt	83,0	34,5	74,7	30,1
5	Am 14. { Zellenkonz. je 10^{-5} cm^3 . . .	60	240	45	185
6	Kultur- { Lichtabsorption, Prozent . .	27,5	50	15	37
7	tag { je Zelle absorbiert, 10^{-12} Watt	76,2	34,7	50,2	31,0
8	Lichtausnutzung, Prozent der gesamten Strahlungsleistung	2,0			
9	Ausnutzung des absorbierten Lichtes, %	6,3			

der mittleren Lichtabsorption des gleichen Tages in Beziehung gesetzt wurde. Die absorbierte Energie wurde also mit etwas besserem Wirkungsgrad ausgenutzt als in den Kulturen mit schwachem Licht. Bei den Schwachlichtkulturen mußte nämlich eine gegenüber der Erntemenge 6—20 mal größere Menge an Zellsubstanz¹ außer mit der Energie, die für die Bildung neuer Substanz benötigt wurde, ständig

¹ In Kultur E (Tab. 4) betrug der tägliche Zuwachs 0,1 g Trockensubstanz; die gesamte Zellsubstanz der Kulturröhre hatte ein Trockengewicht von 1,5—2 g.

mit der zur Aufrechterhaltung des Lebens erforderlichen Energie versorgt werden. Diese „Ballast-Substanz“ macht bei den Starklichtkulturen nur ungefähr ein Viertel der Erntemenge aus. Über den Quantenverbrauch je Zellteilung läßt sich nur aussagen, daß er zwischen 10 und $15 \cdot 10^{12}$ Quanten liegen dürfte. Damit liegt er nur wenig über den für geringe Lichtabsorption der Einzelzelle gefundenen Werten.

Der Erhöhung der Vermehrungsintensität gegenüber den Teilungsraten der Schwachlichtkulturen ging wiederum eine starke Erhöhung des Stickstoffanteiles der gebildeten organischen Substanz parallel (Tab. 7), während sich der Lipidgehalt

Tabelle 7. *Chlorella pyrenoidosa*. Vermehrung und Analysenwerte von im Starklicht gewachsenen Zellen mit einer Leistungsabsorption von $46-57 \times 10^{-12}$ Watt.

Kulturgruppe	S ₁	S ₂
Je Zelle absorbiert, 10^{-12} Watt	57 ¹	46 ¹
Vermehrungsfaktor, Mittel aus acht aufeinanderfolgenden Tagen	3,7	3,5
Generationsdauer in Tagen bei (theoretischer) Zweiteilung	0,5	0,5
Reduzierter Stickstoff, Prozent der Trockensubstanz	9,90	9,76
Löslicher Stickstoff, Prozent der Trockensubstanz	0,684	
Lipide, Prozent der Trockensubstanz	21,1	21,9

¹ Mittelwert aus den Daten der Zeilen 4 und 7 in Tab. 6.

nicht wesentlich änderte. Besonders deutlich werden die Verhältnisse, wenn man die Zusammensetzung und Menge der Substanz einer Zelle im Zusammenhang mit den Daten der Schwachlichtkulturen betrachtet (Tab. 8). Bis auf die Lipide, die überall in ungefähr gleicher

Tabelle 8. *Chlorella pyrenoidosa*. Gewicht und Zusammensetzung einer Zelle bei unterschiedlicher Vermehrungsintensität; Generationsdauer zwischen 0,5 und 20 Tagen.

Kulturgruppe	E ₁	F ₁	G ₁	H ₁	S ₁
Je Zelle absorbiert, 10^{-12} Watt	1,4	2,8	4,4	5,4	57
Vermehrungsfaktor	1,050	1,065	1,1	1,13	3,7
Generationsdauer, Tage	20	14	10	7,7	0,5
Gewicht einer Zelle, 10^{-12} g	5,86	6,84	7,03	7,36	8,03
Lipide in Prozent d. Trockensubst.	22,3	22,1	22,5	22,8	21,1
Eiweiß in Prozent d. Trockensubst.	37,50	39,24	39,62	41,90	57,7
Kohlenhydrate in Prozent d. Trockensubstanz	32,3	29,3	28,6	26,1	7,0
Asche in Prozent d. Trockensubstanz	5,72	5,98	6,06	6,30	10,02
Eisen in Prozent d. Trockensubstanz	0,098			0,10	0,60

Menge vorhanden waren, erwiesen sich alle untersuchten Verbindungen in ihrem Anteil an der Zellsubstanz von der durch die Zelle absorbierten Lichtleistung abhängig. Auf die Inten-

sivierung der Zellteilungstätigkeit bei stärkerer Beleuchtung ist bereits hingewiesen worden. Sie beträgt in der Starklichtkultur S_1 das Vierzigfache der Teilungsfrequenz der Schwachlichtkultur E_1 , wie aus dem Vergleich der Generationsdauer bei Zweiteilung hervorgeht¹. Auffallend ist, daß sich das Gewicht der Durchschnittszelle mit zunehmender Lichtintensität also bei schnellerer Zellteilungsfolge, erhöhte: $5,9 \cdot 10^{-12}$ g im schwächsten, $8 \cdot 10^{-12}$ g im stärksten Licht. Der Eiweißgehalt der Zellen stieg in der Versuchsreihe von 37,5 auf 57,7% der Trockensubstanz, und der Anteil der Verbrennungsrückstände verdoppelte sich nahezu unter den gleichen Bedingungen.

Besonders auffällig ist die Vermehrung des Eisengehaltes der Zellen; er betrug bei den Starklichtchlorellen das Sechsfache des Wertes der bei wenig Licht herangewachsenen. Die Asche der Algen mit dem hohen Eisengehalt war schwarz gefärbt gegenüber rein weißer Färbung der Verbrennungsrückstände der anderen Algen. Dies läßt auf (adsorptive?) Bindung großer Eisenmengen an der Zelloberfläche schließen. Sicher sind infolge der starken Vermehrungstätigkeit auch die eisenhaltigen Fermente angereichert. Aber die Erhöhung der Werte für Asche und Eisen braucht nicht unbedingt mit dem Lichtwert in der Kultur und der Zellteilungsgeschwindigkeit verknüpft zu sein. Es ist durchaus denkbar, daß es bei Kulturen mit geringer Zelldichte nur deshalb zu einer vermehrten Einlagerung kommt, weil hier der auf eine Zelle entfallende Anteil von Salzen der Nährlösung größer ist und weil mit der vermehrten Einlagerung kein zusätzlicher Verbrauch an Energie verbunden sein dürfte.

Die Vermehrung der Eiweißstoffe geht offenbar auf Kosten der Kohlenhydratsynthese vor sich, denn der Anteil der Kohlenhydrate fällt bei Erhöhung der Vermehrungsrate von 32 auf 7% der Trockensubstanz. Diese geringe Menge läßt vermuten, daß es bei schneller Zellteilungsfolge nur zur Ausbildung einer sehr dünnen Zellmembran kommt.

γ) Alternde Kulturen.

In den vorstehenden Versuchen wurde angestrebt, durch regelmäßigen Ersatz der verbrauchten Kulturlösung und durch Entfernung des Zuwachses einen bestimmten Zustand der Kulturen aufrechtzuerhalten und somit Alterserscheinungen möglichst zu vermeiden. Bei dem folgenden Versuch sollen dagegen die Veränderungen beim „Altern“ einer *Chlorellakultur* erfaßt werden. Damit die Veränderungen möglichst rasch vor sich gehen, soll auf die Einzelzelle eine große Lichtleistung entfallen, was der Fall ist, wenn die Zelldichte in der Kultur relativ niedrig gehalten wird. Das ist z. B. durch entsprechende Regulierung der Stickstoffversorgung möglich.

Die in Kap. II, A, 2 beschriebenen Versuche haben ja gezeigt, daß die Zellen bei einem bestimmten Stickstoffgehalt, nämlich $1,6 \cdot 10^{-13}$ g, ihre Teilungen einstellen. Soll nur eine begrenzte Anzahl Zellen in der Kultur herangezogen werden, so kann man die Mengen assimilierbaren Stickstoffs entsprechend beschränken;

¹ Vgl. die Ausführungen hierzu in Kap. I, 2g.

durch Multiplikation der gewünschten Zellenzahl mit der aufgeführten Mindeststickstoffmenge je Zelle kann die für eine bestimmte Anzahl Zellen erforderliche Stickstoffmenge berechnet werden. Sie betrug in unserem Fall $3,9 \cdot 10^{-2}$ g, die als KNO_3 zu jeder der zwölf Kulturen (Inhalt 1410 cm^3) zugesetzt wurden. Die Konzentration der übrigen Salze war wie in Kap. I, 2e für Nährlösung II angegeben. Die dauernd eingestrahle Lichtleistung betrug dabei im Mittel 1,66 Watt, die Temperatur 25°C , und die eingblasene Luft war, wie stets, mit 5% Kohlensäure versetzt.

Die Algen wurden aus den zwölf Kulturen nacheinander in sich vergrößernden Zeitabständen geerntet. Um etwa vorhandene Unterschiede zwischen den einzelnen Kulturen und Zufallswerte auszuschließen, wurde der Inhalt sämtlicher Röhren vor der Probenentnahme zusammengegossen und der Rest anschließend wieder auf eine entsprechend geringere Anzahl Röhren verteilt.

Die Veränderungen eines Teils der kontrollierten Faktoren und Substanzmengen sind in Abb. 13 in Abhängigkeit vom Alter der Kultur graphisch dargestellt. Die einzelnen Kurven veranschaulichen

1. die eingestrahle Energie (Lichtmenge);
2. den Prozentsatz des zu dem betreffenden Zeitpunkt absorbierten Anteils der Strahlungsleistung;
3. die gesamte bis zu dem betreffenden Zeitpunkt bereits absorbierte Energie;
4. die als Wärmehalt der organischen Substanz gebundene Energie (um den Kurvenverlauf zu verdeutlichen, sind sämtliche Werte mit 10 multipliziert!);
5. die Zellenkonzentration;
6. den Vermehrungsfaktor;
- 7.—11. die Menge und Zusammensetzung der gebildeten organischen Substanz:
F Neutralfette und (durch Kurve 8 abgeteilt) sonstige Lipide;
Z Zellulose, Zucker und sonstige Kohlenhydrate;
E Eiweiß und andere Stickstoffverbindungen;
A Asche;
- 12.—18. Trockengewicht und Zusammensetzung der Durchschnittszelle zu verschiedenen Zeiten der Kultur (das Trockengewicht der Durchschnittszelle ist dem Radius der Kreise proportional und der Prozentsatz der Substanzen den Winkeln);
19. die gebundenen Kohlenstoffatome;
20. die in der Kultur als NO_3 verfügbare Stickstoffmenge¹;
21. die Menge reduzierten Stickstoffs²;
22. den Anteil löslicher Stickstoffverbindungen am Gesamtstickstoff (mit 2 multipliziert!).

Die zur Beimpfung verwandten Zellen stammten aus einer Kultur, die bereits sehr dicht war und eine sehr langsame Zellteilungsfolge aufwies. Die eingimpfte Algenmenge, 15 Zellen in 10^{-5} cm^3 , war in der Nährlösung mit bloßem Auge nur an einer schwachen Trübung zu erkennen. In dem starken Licht und der frischen Nährlösung begannen sich die Zellen rasch zu teilen (Kurve 6), die Kulturen wurden schnell hellgrün und bald darauf dunkelgrün. Das Gewicht der Durchschnittszelle hatte sich währenddessen erhöht, es betrug am dritten Tag (Nr. 13) $8 \cdot 10^{-12}$ g gegenüber

¹ Vom 4. Tag an war die Menge NO_3 in der Nährlösung $< 1\%$ der ursprünglichen Gabe.

² Vor dem 4. Tag aus der Abnahme der Nitratkonzentration erschlossen.

$6,6 \cdot 10^{-12}$ g der Impfzellen. Der Gehalt an Stickstoffverbindungen, der zur Zeit der Beimpfung 42% der Trockensubstanz ausgemacht hatte, war am dritten Tag auf 62% angestiegen. Am vierten Tag war jedoch der assimilierbare Stickstoff in der Nährlösung (Kurve 20) erschöpft, und die Zellen konnten sich nun nur noch unter Verminderung des Eiweißgehaltes der Einzelzellen teilen, deren Gewicht (Nr. 14) auf $5,3 \cdot 10^{-12}$ g zurückging. Am fünften Tag war die maximale Zellenzahl, 1630 Zellen in 10^{-5} cm³ (Kurve 5), erreicht; der Vermehrungsfaktor ging auf 1 zurück. Die weitere Substanzvermehrung (Kurve 7) ging durch Gewichtszunahmen der Einzelzellen (Nr. 14—18) vor sich. Am fünften Tag hatte auch die Absorption des in die Kultur eingestrahltten Lichtes (Kurve 2) ihren Höhepunkt erreicht.

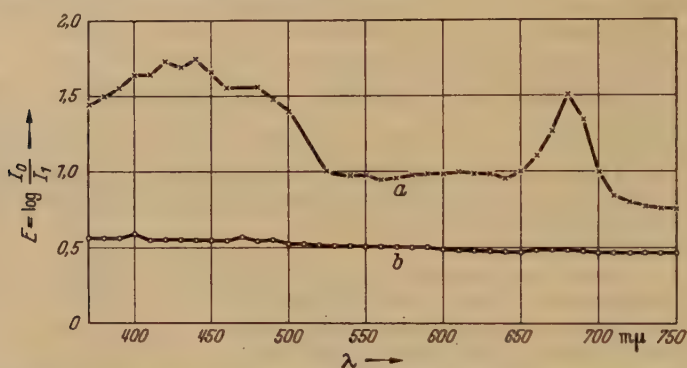


Abb. 10. *Chlorella pyrenoidosa*. Extinktion einer Zellaufschwemmung in aqua dest. a) aus vollständiger Nährlösung (400 Zellen in 10^{-5} cm³), b) aus Stickstoffmangellösung (800 Zellen in 10^{-5} cm³).

Während die Zellenzahl weiterhin unvermindert beibehalten wurde, ging hingegen die Absorption von diesem Tage an wieder zurück, denn die Farbstoffe in den Algen wurden wieder abgebaut. Die tiefgrüne Färbung der Kultur wurde erst gelbgrün und dann gelb; am Ende des Versuchs war die Lösung nur noch milchig trüb. In Abb. 10 ist das Extinktionsspektrum¹ der farbstoffreichen Impfalgen dem der fast farblosen Algen der „gealterten“ Kultur, beide in destilliertem Wasser, gegenübergestellt. In den letzteren sind nur noch so wenig Farbstoffe vorhanden, daß ihre Absorptionsmaxima kaum noch angedeutet sind. Z. B. sank der Chlorophyllgehalt der Algen vom 1. bis zum 25. Tag der Kultur von 4,1% der Trockensubstanz auf 0,06% ab. Trotzdem wurden immer noch mehr als 50% des eingestrahltten Lichtes „absorbiert“ (Kurve 2). Der gleichmäßige Verlauf der Extinktionskurve läßt allerdings darauf schließen, daß die Lichtschwächung hauptsächlich auf Streuung be-

¹ Aufgenommen mit einem BECKMAN-Spektralphotometer. Die Werte sind des besseren Vergleichs wegen als $E = \log I_0/I_1$ aufgetragen. Die biologische Bedeutung der Lichtabsorption in Prozent (SEYBOLD u. WEISSWEILER, 1943) bleibt unbestritten.

ruhte. Zur Ausmessung der Extinktionskurve der farbstoffreichen Algen wurde eine Suspension mit einer nur halb so großen Zelldichte benutzt. Zumindest ist also der Betrag, um den die Werte dieser Kurve die Werte der farbstoffarmen Algen überragen, auf echte Absorption durch Farbstoffe zurückzuführen. Der Kurvenverlauf zeigt beim Vergleich mit dem Absorptionsspektrum der Farbstofflösungen in Methanol (Abb. 11) er-

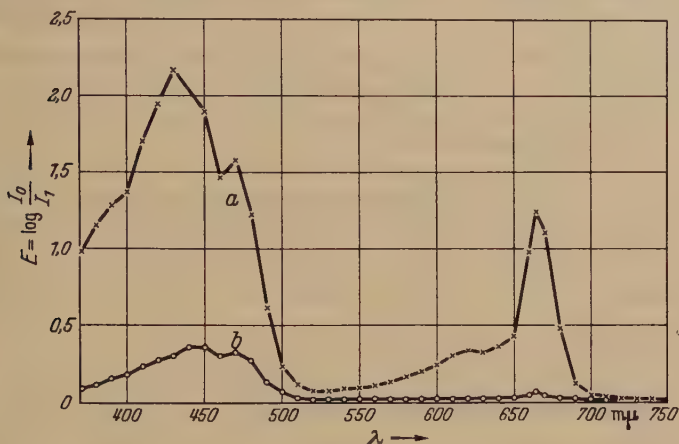


Abb. 11.

Abb. 11. *Chlorella pyrenoidosa*. Extinktion des Methanolauszuges von Zellen a) aus vollständiger Nährlösung, b) aus Stickstoffmangellösung. (Kurve b aus zehnmal soviel Trockensubstanz wie Kurve a).



Abb. 12.

hebliche Unterschiede sowohl in der Lage der Minima und Maxima, als auch in dem Verhältnis der Extinktion der Extremwerte. Diese bereits wiederholt beobachtete Erscheinung wird auf die Art der Bindung zurückgeführt, in der die Farbstoffe in vivo vorliegen (vgl. NODDAK u. EICHHOFF, 1939; SEYBOLD u. WEISSWEILER, 1942).

Die absorbierte Energie wurde bei laufend verminderter Lichtausnutzung in erster Linie in Neutralfetten gespeichert, die vom 15. Tag der Kultur an etwa 90% der Lipotide ausmachten. Im Mikroskop ließen sich bei diesen Zellen (Abb. 12) neben einem schmal sichelförmigen Chloroplasten im wesentlichen nur ein oder mehrere große Fetttropfen erkennen. Dabei war das Gewicht der Durchschnittszelle verdoppelt (Abb. 13, Nr. 17). Der Anteil der Phospholipide an den Lipoiden

stieg von 0,6 bis auf 1,2%. Gleichzeitig fiel der Anteil der Kohlenwasserstoffe an den Lipiden von 1,4 auf 0,2% und der der Sterinester (?) von 2,3 auf

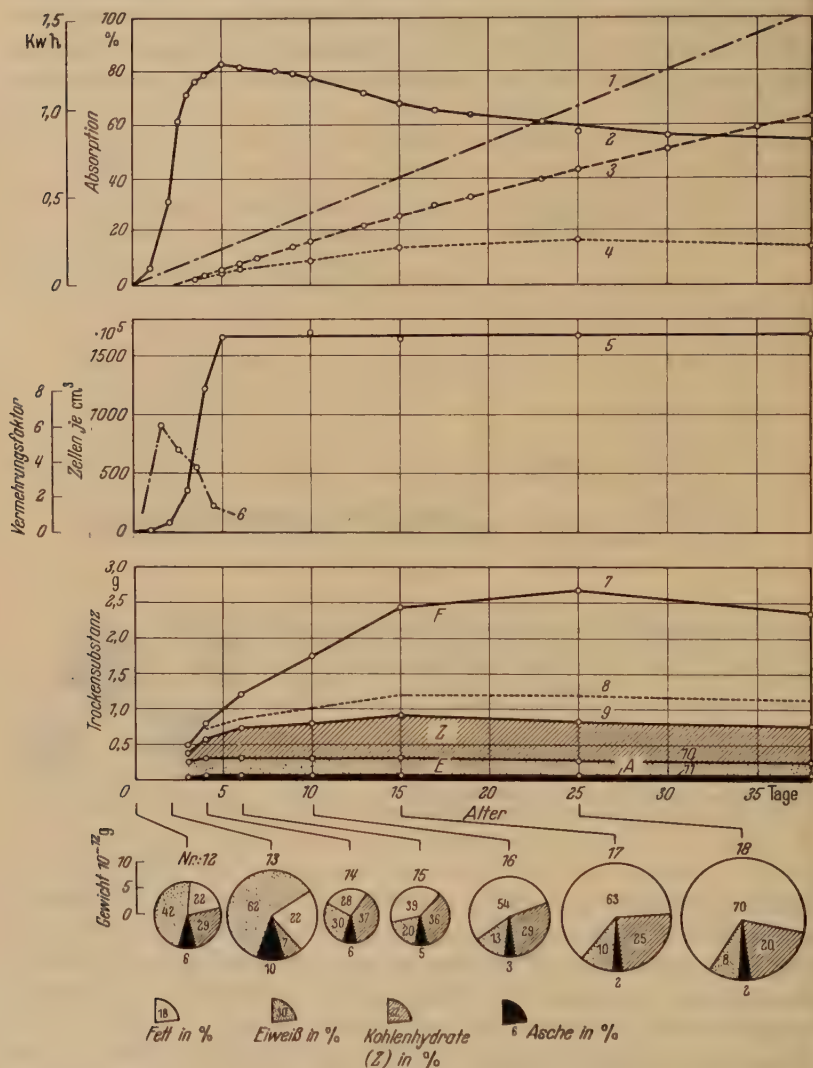


Abb. 13. (Forts. S. 237.)

1,8%. Die geringen Werte der freien Sterine ($< 0,4\%$)¹ erlaubten es nicht, Schlüsse auf ihr Verhalten zu ziehen. Bis zum 15. Tage wurden auch noch Kohlenhydrate aufgebaut; von diesem Tage an nahm die Menge der vor-

¹ Bestimmt durch Digitoninfällung nach WINDAUS (1910).

handenen Kohlenhydrate wieder ab. Offenbar nahmen Abbauvorgänge (Photooxydationen?) einen immer größeren Umfang an, denn auch die Eiweißmenge verminderte sich. Es wurden aber noch weiterhin so viel Fette synthetisiert, daß die Gesamttrockensubstanz noch anstieg. In diesem Zeitraum um den 15. Tag haben sicher wesentliche Umstellungen des Stoffwechsels stattgefunden. Bis zu diesem Termin zeigte die Menge der gebundenen Kohlenstoffatome (Abb. 13, Kurve 19) einen fast gradlinigen Anstieg; die Zahl der in 24 Std assimilierten Kohlenstoffatome sank vom 4. Tag ($5,5 \cdot 10^{21}$) bis zum 15. Tag ($4,7 \cdot 10^{21}$) nur um 14%, in der Folgezeit bis zum 25. Tag aber rasch auf den

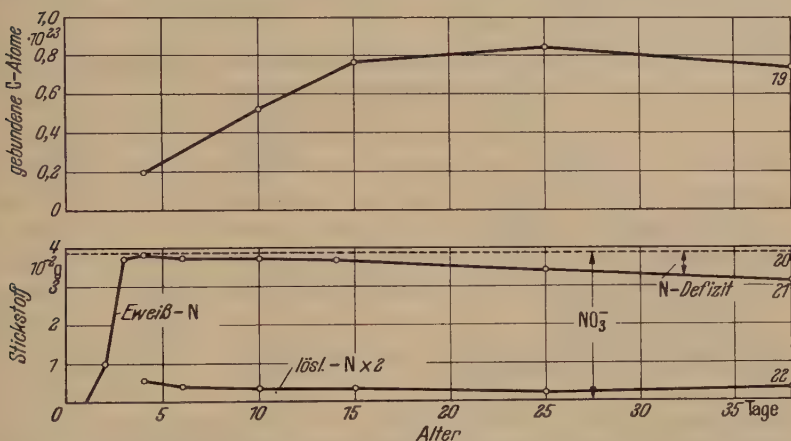


Abb. 13. *Chlorella pyrenoidosa*. Veränderungen beim „Altern“ einer Kultur in Stickstoffmangel-lösung. Erster Teil der Abbildung auf S. 236. Erläuterung im Text.

zehnten Teil. Es fand nur noch eine geringe Zunahme der gesamten Substanz statt.

Vom 25. Tage an hatten destruktive Reaktionen die Oberhand gewonnen; nun werden auch mehr Fette abgebaut als synthetisiert. Der Phosphatidgehalt stieg auf 1,9% der gesamten Lipide, und der Eiweißabbau wurde durch eine Zunahme der löslichen Stickstoffverbindungen (Kurve 22) unterstrichen. Lediglich die Aschenmenge blieb bei diesem Geschehen konstant.

Auch in diesem Zustand vermochten die Algen auf Stickstoffzusatz innerhalb weniger Stunden zu ergrünen. Es trat allerdings keine Zellenvermehrung wieder ein. Dazu bedurfte es vielmehr völlig neuer Nährlösung. Offenbar wurde die Zellteilung durch Abbauprodukte aus der beginnenden Autolyse, die sich nun in der alten Nährlösung befanden, unterbunden; SPOEHR und Mitarb. (1949) haben in solchen Kulturen niedere Fettsäuren als wirksames Agens identifiziert.

B. *Ankistrodesmus falcatus* und *Scenedesmus obliquus*.

Versuche mit *Ankistrodesmus* und *Scenedesmus* hatten ähnliche Ergebnisse wie die mit *Chlorella*. Allerdings konnten Zuwachs und Erntemengen von *Ankistrodesmus* nicht quantitativ erfaßt werden, da sich diese Alge bei unseren Versuchen stets in Höhe des Wasserspiegels an der Innen- und Außenwand der Kulturröhren in großen Mengen festsetzte. Nach den Untersuchungen ROHDES (1948) zeigt *Ankistrodesmus* nur bei sehr geringen Nährsalzkonzentrationen optimales Wachstum; man kann deshalb annehmen, daß die Konzentration der Nährsalze in unseren Lösungen für die Alge zu groß war.

In Tab. 9 sind die Analysendaten der in Stickstoffmangellösung verfetteten Algen angegeben. Die *Ankistrodesmus*kultur wurde nach 10,5 Tagen in Nährlösung II mit $1,26 \cdot 10^{-3}$ KNO₃ ausgewertet. Sie hatte gelbe Färbung. Die *Scenedesmus*kultur in Nährlösung nach GERDES (1951) wurde nach 17 Tagen ausgewertet; sie war rötlich-braun gefärbt. Offenbar gehörte dieser Stamm zu den

Tabelle 9. *Scenedesmus obliquus* und *Ankistrodesmus falcatus*. Analysenergebnisse von bei Stickstoffmangel verfetteten Algen.

	<i>Scenedesmus obliquus</i>	<i>Ankistrodesmus falcatus</i>
Lipoide, % d. Trockensubstanz	43,3	37,7
Neutralfette } % der {	79,1	76,2
Farbstoffe } Lipide {	9,0	13,8
Phosphatide }	2,1	1,6
Reduzierter Stickstoff, % d. Trockensubstanz.	1,7	1,9
Kohlenhydrate, % d. Trockensubstanz. .	44,2	48,0
Asche, % d. Trockensubstanz.	1,9	2,5

Pflanzen, die beim Altern neue, sonst nicht vorhandene Farbstoffe ausbilden. Solche Erscheinungen kennt man von *Haematococcus* (TISCHER, 1944), *Proto-siphon* (STRAIN, 1949) und vielen anderen.

Beim Vergleich der Analysenergebnisse von *Scenedesmus* und *Ankistrodesmus* mit denen von *Chlorella* fällt der hohe Kohlenhydratanteil auf. *Chlorella pyrenoidosa* mit einer vergleichbaren Menge Lipoiden, 39,2%, enthielt 3,16% Stickstoff und 36,1% Kohlenhydrate; *Chlorellen* mit vergleichbarem Stickstoffanteil 1,8%, enthielten 65,1% Lipoiden und nur 21,7% Kohlenhydrate. Das Verhältnis Eiweiß zu Kohlenhydraten ist bei *Ankistrodesmus* und *Scenedesmus* mehr zur Seite der Kohlenhydrate verschoben.

III. Besprechung.

SPOEHR und MILNER (1949) haben gezeigt, daß die Zusammensetzung der organischen Substanz von *Chlorella* bei Stickstoffmangel außerordentlichen Veränderungen unterworfen sein kann. Sie sind in erster Linie durch entgegengesetztes Verhalten des Eiweiß- und Lipoidanteiles charakterisiert. Diese Erscheinung, die auch von Hefen bekannt ist (STEINER, 1938; HEIDE, 1939; RIPPEL, 1940; BERNHAUER, 1946; REINARTZ, 1950), bestimmt die Ergebnisse der Versuche über die Abhängigkeit der Substanzzusammensetzung vom Nitratgehalt der

Nährlösung (Kap. II, A, 2). Eine stoffwechselphysiologische Erklärung dieser Erscheinung liegt nahe:

Die bei der Photosynthese gebildeten primären Assimilate (BENSON, CALVIN u. a., 1949) werden im Intermediärstoffwechsel zu Ketosäuren verarbeitet. In dem Maße, wie durch Abbau von Assimilaten oder durch direkte Verknüpfung mit der Photosynthese (WARBURG u. NEGELEIN, 1920; BURSTRÖM, 1942, u. a.) reduzierter Stickstoff zur Verfügung steht, werden die Ketosäuren in Aminosäuren (CALVIN u. BENSON, 1949) umgewandelt. Beim Fehlen von Stickstoff können natürlich keine Aminosäuren gebildet werden. Der sich infolge der Zellteilungen vermindern Eiweißbestand der Zellen kann daher nicht ergänzt werden; bei $1,6 \cdot 10^{-13}$ g Stickstoff je Zelle entsprechend $0,9 \cdot 10^{-12}$ g Eiweiß (unter Berücksichtigung der stickstoffhaltigen Nichteiweiß-Verbindungen) wird dann — wie unsere Versuche gezeigt haben — die Vermehrung eingestellt. Die Assimilate werden nunmehr unter Reduktion zu höheren Fettsäuren kondensiert. Die aus der Photosynthese anfallende Energie wird in Neutralfetten gespeichert, den energiereichsten Bausteinen der organischen Substanz.

Ein beträchtlicher Teil der Assimilate wird jedoch stets zum Aufbau von Lipoiden verwandt. Es ist in den vorstehenden Versuchen nicht gelungen, *Chlorella pyrenoidosa* mit weniger als 21% Lipoiden heranzuziehen, obwohl SPOEHR und MILNER für Algen von ihrem Stamm aus der Elementarzusammensetzung einen Lipoidgehalt von nur 4,5% berechnet haben. Der niedrigste Lipoidanteil auch der von MILNER (1948) veröffentlichten *Chlorella*-Extraktionen betrug 23,5% und liegt somit in der Nähe unserer Werte.

Die maximale Lipoidmenge betrug bei unseren Versuchen 70% der Trockensubstanz. (MILNER analysierte bei vergleichbarer Extraktionsmethode *Chlorella*, die in Stickstoffatmosphäre mit 5% Kohlensäure herangezogen war und sogar 76% Lipoide enthielt). Die Erhöhung des Fettanteiles von 21% auf 70% ging in unseren Versuchen nicht auf Kosten der übrigen Substanz vor sich. Unter allen kontrollierten Faktoren gingen nur die Werte für die Farbstoffe auch absolut zurück. Diese Erscheinung kann zur Zeit noch nicht hinreichend erklärt werden; Versuche, die hierüber Aufklärung schaffen sollen, sind in Vorbereitung. Der Vergleich der in Tab. 1 und 2 aufgeführten Werte für die Substanzzusammensetzung bei unterschiedlichem Nitratgehalt der Nährlösung zeigt, daß die Substanz aller bei gleichzeitiger Ernte so verschiedenartig zusammengesetzten Kulturen trotzdem in einem bestimmten physiologisch definierten Zeitpunkt — nämlich der Einstellung der Zellvermehrung — die gleiche Zusammensetzung aufwies. Die unterschiedlichen Nitratgaben bewirkten nämlich, daß der assimilierbare Stickstoff in den Kulturen verschieden rasch erschöpft war. Dies war natürlich in den Kulturen mit den geringsten Nitratgaben zuerst der Fall. Hier wurde die Zellteilung daher zuerst eingestellt und die Fettsynthese am frühesten begonnen. In den anderen Kulturen traten die gleichen Erscheinungen in der Reihenfolge der

abgestuften Nitratgaben auf. Alle Kulturen verliefen also über die gleichen Stadien (Tab. 2), nur zeitlich verschoben. In der Zeit bis zur Einstellung der Zellteilungen, in der Vermehrungsphase, wird die absorbierte Energie zur Erzeugung von Zellsubstanz benutzt, die dann zur Bildung neuer Zellen dient; nach der Sistierung der Zellenvermehrung wird in der Speicherphase die Energie in Neutralfetten gespeichert. Das sind die gleichen Erscheinungen, die LINDNER (1917) und FINK u. Mitarb. (1938) bei Hefen als Eiweiß- und Fettgeneration kennzeichneten und die DENK-CZURDA (1942) bei heterotrophen Flagellaten Konkordanz- und Diskordanzstadium nannte. (Vgl. hierzu auch v. WIRSCH, 1948, und v. DENFFER, 1948).

Auch bei optimaler Nährstoffversorgung ist eine erhebliche Variation in der Zusammensetzung der *Chlorellasubstanz* möglich, wie die Versuche über die Lichtabhängigkeit der Substanzzusammensetzung (Kap. II, A, 3) deutlich zeigten. Bei größerer Energieaufnahme infolge stärkerer Beleuchtung und Lichtabsorption der Einzelzelle wurde offenbar die Bildung von Aminosäuren besonders gefördert, was man auch aus dem erhöhten Anteil löslicher Stickstoffverbindungen schließen kann. Die Folge war eine verstärkte Eiweißsynthese. Der Lipoidgehalt blieb nahezu konstant, während der Kohlenhydratanteil auf sehr niedrige Werte sank (Tab. 8). Dem Antagonismus Fett — Eiweiß, gesteuert durch den assimilierbaren Stickstoff in der Nährlösung, kann man also den Antagonismus Eiweiß — Kohlenhydrate gegenüberstellen, der durch die Lichtleistung ebenfalls gesteuert werden kann. Beide Erscheinungen liegen dem Schema in Abb. 14 über die Steuerung von *Chlorellakulturen* zugrunde. In Kulturen mit optimalen Nährstoffgaben und schwacher Beleuchtung der Einzelzelle wird sich die in der Mitte des Schemas gekennzeichnete Substanzzusammensetzung ergeben mit ungefähr 5% Asche, 22% Lipoiden, 37% Eiweiß und 36% Kohlenhydraten. Bei starker Beleuchtung der Einzelzelle und optimaler Nährstoffversorgung zeigt der linke Teil des Schemas, daß der Prozentsatz an Eiweiß zunimmt und der Kohlenhydratanteil sinkt. Der Aschenanteil erhöht sich auch etwas. Bei Stickstoffmangel — rechts im Schema — nimmt dagegen der Prozentsatz an Lipoiden zu, der Kohlenhydrat- und besonders der Eiweißanteil an der gebildeten Substanz geht zurück. Die Extremwerte der Stickstoffmangelerscheinung wurden bisher nur bei verhältnismäßig starker Beleuchtung erreicht. Selbstverständlich gibt es alle Übergangsstufen; in einer Kultur können alle Stadien von links nach rechts in natürlicher Folge durchlaufen werden.

Der Erhöhung des Eiweißanteiles an der Substanz ging in allen beschriebenen Versuchen eine Vervielfachung der Teilungsfrequenz parallel. In den bei Stickstoffmangel alternden Kulturen kam es trotz reichlicher Energiestrahlung und der Synthese aller Zellsubstanzen

außer Eiweiß zur Einstellung der Zellteilungen. Die Bedeutung des Prozentsatzes der Eiweißstoffe an der Gesamtsubstanz für die Vermehrungsintensität scheint damit erwiesen.

PRATT (1940) hat bei *Chlorella vulgaris* und v. DENFFER (1948 a) bei *Nitzschia palea* eine Einstellung der Zellteilungstätigkeit trotz ausreichender Nährstoffversorgung gefunden. Beide Autoren machen einen spezifischen Hemmstoff für diese Erscheinung verantwortlich, der nach PRATT (1943) über die Photosynthese und nach v. DENFFER (1948 b) direkt auf die Mitose wirken soll. Zwar vermag man nach den vorstehenden Ergebnissen nicht in dieser Frage zu entscheiden, doch liegt die Vermutung nahe, daß es sich auch bei den von den beiden Autoren beschriebenen Erscheinungen um einen Mangel an Eiweißsubstanz gehandelt haben könnte, der möglicherweise in einer Vergiftung der zur Stickstoffassimilation benötigten Fermente seinen Grund hat.

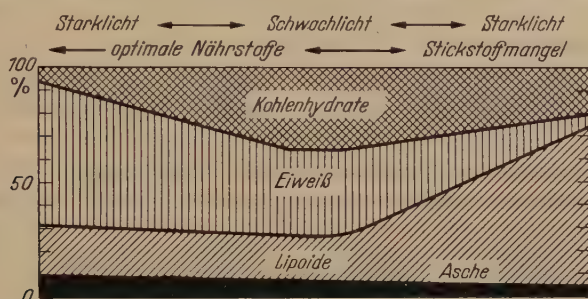


Abb. 14. Schema zur Steuerung von *Chlorella*-Kulturen. Die Zusammensetzung der organischen Substanz in Abhängigkeit vom Licht und assimilierbarem Stickstoff.

Die Befunde über die steigenden Stickstoffmengen in der organischen Substanz bei verstärkter Beleuchtung der Einzelzelle stehen im Widerspruch zu Untersuchungen von MYERS (1946 a), der eine Abnahme des Stickstoffgehaltes der *Chlorellen* bei Verstärkung der Beleuchtung fand. Auffallende Unterschiede in den Stoffwechseleigentümlichkeiten nahe verwandter Arten und sogar zwischen verschiedenen Stämmen der gleichen Art sind schon öfter beobachtet worden (z. B. GAFFRON, 1939). Der Gegensatz könnte aber auch methodische Gründe haben. Der Stickstoffgehalt wurde nämlich von MYERS nach der KJELDAHL-Veraschung durch Zusatz von NESSLERS Reagenz colorimetrisch bestimmt. Diese Methode liefert unter Umständen keine exakten Werte (THIEL, 1939). MYERS gibt zudem an, daß Kontrollanalysen nach der Methode von DUMAS geringere Stickstoffwerte ergaben. Dies legt die Vermutung nahe, daß auch hier an der Genauigkeit der Colorimeterwerte einige Zweifel berechtigt sind. Da die KJELDAHL-Methode nur reduzierten Stickstoff erfaßt, müßte die Methode nach DUMAS bei Nitraternährung nämlich höhere Werte ergeben.

An anderer Stelle hat MYERS (1946b) u. a. nachgewiesen, daß bei steigender Beleuchtungsstärke die Photosynthese — gemessen an der Sauerstoffabgabe — noch zunimmt, wenn die Erhöhung der Substanzproduktion bereits eingestellt ist. Zur Erklärung dieser Erscheinung diskutieren MYERS und JOHNSTON (1949) auch die Möglichkeit, daß bei verstärkter Beleuchtung mehr reduzierte Substanz gebildet würde. Die vorstehend gefundene Erhöhung des Eiweißanteiles im Starklicht könnte

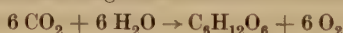
eine Stütze für diese Annahme bilden. MYERS führte seine Assimilationsmessungen in vollständiger Nährlösung aus, so daß also Eiweißstoffe synthetisiert werden konnten. Das Eiweiß steht auf einer höheren Reduktionsstufe als die Kohlenhydrate. Bei Vermehrung des Eiweißgehaltes durch verstärkte Beleuchtung der Einzelzelle steigt daher auch der Energieinhalt je Einheit Trockensubstanz (Tab. 10). Bei Versuchen in Carbonatpuffern ist die gleiche Erscheinung zu erwarten, nur daß sie dann auf Fettsynthese (Abb. 14, Stickstoffmangel) zurückzuführen sein wird.

Tabelle 10. *Chlorella pyrenoidosa*. Verbrennungswärme der Trockensubstanz bei unterschiedlicher Lichtabsorption durch die Einzelzelle (berechnet aus der Zusammensetzung der organischen Substanz).

Kulturgruppe	E ₁	F ₁	G ₁	H ₁	S ₁
Je Zelle absorbiert, 10 ⁻¹² Watt	1,4	2,8	4,4	5,4	57
cal/g Trockensubstanz	5600	5640	5650	5680	5790

Diese Erscheinungen sind von grundsätzlicher Bedeutung bei allen manometrischen Bestimmungen der Quantenausbeute an Einzellern. Bei höheren Pflanzen ist es durchaus die Regel, daß die von einem Blatt absorbierte Energie ausschließlich in Form von Kohlenhydraten gespeichert wird (SMITH, 1944); erst nach Abtransport der Assimilate vom Ort ihrer Entstehung findet in anderen Teilen der Pflanze ein Umbau der Kohlenhydrate zu Lipoiden und Eiweiß statt, wobei ein Teil der Kohlenhydrate zur Beschaffung der erforderlichen freien Energie veratmet werden muß. Diese räumliche Trennung kann es selbstverständlich bei Einzellern nicht geben. Auch eine zeitliche Trennung zwischen der Synthese von Kohlenhydraten und deren weiterer Reduktion wurde bisher nicht nachgewiesen.

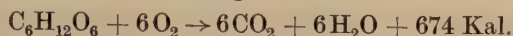
Bei der manometrischen Bestimmung der für die Assimilation einer Molekel CO₂ erforderlichen Quantenzahl legt man meist die Gleichung



zugrunde. Tatsächlich werden aber die gebildeten Kohlenhydrate teilweise zu Kohlenstoffverbindungen höherer Reduktionsstufen weiter verarbeitet. (Beim Fehlen von assimilierbarem Stickstoff werden Fettsäuren synthetisiert.) In der Tatsache, daß der Assimilations- und Atmungsquotient bei diesen Messungen annähernd = -1 war, glaubte man dennoch die Bedingungen obiger Gleichung erfüllt zu sehen. Auf der anderen Seite ist es aber bisher nicht gelungen, unter Bedingungen, unter denen ohne Zweifel fast ausschließlich Fette synthetisiert wurden, den theoretischen Assimilationsquotienten -0.7 experimentell nachzuweisen (PIRSON u. WILHELMI, 1950). Er wurde offenbar durch andere Prozesse verdeckt. Der Gaswechselquotient gibt eben die Bilanz aller Stoffwechselprozesse, und man kann ihn nicht willkürlich auf einen Stoffwechselprozeß beziehen (vgl. auch MYERS, 1949).

In den Tab. 5 und 6 ist auch die Lichtausnutzung angegeben. Sie war bei stärkerer Beleuchtung der Einzelzelle geringer als bei niedrigerer Beleuchtung. Selbst wenn es gelingen sollte, die Lichtausnutzung durch Verbesserung der Kulturmethodik günstiger zu gestalten, bleibt eine Ausnutzung des elektrischen Lichtes zur Produktion organischer Substanz sehr unrationell, wie folgende Überlegung zeigt:

Aus der Umkehrung der Gleichung



und dem elektrischen Wärmeäquivalent

$$1 \text{ kWh} = 8,6 \cdot 10^2 \text{ Kal.}$$

folgt, daß ein theoretischer Organismus, der die absorbierte Energie restlos in Zucker verwandeln könnte, zur Bildung von 1 Mol Glucose eine Lichtmenge von 0,8 kWh benötigt. Wirtschaftlich günstige Leuchtmittel, wie die Quecksilberentladungslampen, wandeln ungefähr 10% des elektrischen Stromes in Licht um (vgl. OSRAM-Liste K). Von Mischlicht können höchstens 50% ausgenutzt werden (WARBURG und Mitarb., 1923, 1951; ARNOLD, 1949, u. a.), und schließlich besteht die organische Substanz nur zum Teil aus wirtschaftlich verwertbaren Stoffen, so daß für 180 g Zucker im günstigsten Fall 80 kWh aufzuwenden wären.

Seit der Arbeit von WARBURG und NEGELEIN (1923) ist bekannt, daß bei der Verwertung des Lichtes zur Photosynthese nicht die absolute Energie, sondern die Zahl der Lichtquanten von Bedeutung ist. Es ist deshalb auch die Zahl der zum Aufbau einer Einheit organischer Substanz mit einem Kohlenstoffatom verbrauchten Quanten in den Tabellen angegeben. Ein Vergleich mit der WARBURGSchen Quantenzahl (je Molekel bis zum Kohlenhydrat reduzierter Kohlensäure) zeigt, daß für eine Verbesserung der Kulturmethode noch genug Spielraum ist. Allerdings wird stets ein Vielfaches des WARBURGSchen Wertes an Quanten benötigt werden, da ein Durchschnittskohlenstoffatom auf einer höheren Reduktionsstufe steht, als der der Kohlenhydrate und im Quantenverbrauch die zur Nitratreduktion aufgewandte Energie enthalten ist. Außerdem ist bei den in dieser Arbeit angegebenen Werten die nur zur Aufrechterhaltung des Lebens aufgewandte Energie nicht abgesetzt.

Zusammenfassung der Ergebnisse.

1. Zur Massenkultur von einzelligen Grünalgen wurden Leuchtstofflampen benutzt, die direkt in die Nährlösung eintauchten. Dabei konnte die eingestrahlte und absorbierte Lichtenergie bequem erfaßt werden.

2. Abgestufter Nitratgehalt der Nährlösung wirkte sich auf die Kulturen nur durch verschieden rasche Erschöpfung des assimilierbaren Stickstoffs aus.

3. Nach Erschöpfung des assimilierbaren Stickstoffs teilten sich die Zellen noch, bis der Stickstoffgehalt der Einzelzelle auf $1,6 \cdot 10^{-13}$ g gesunken war. Dann fanden keine Zellteilungen mehr statt.

4. In einer bei Stickstoffmangel „alternden“ Kultur von *Chlorella pyrenoidosa* wurden die Veränderungen in der Zusammensetzung der organischen Substanz der Zellen verfolgt:

Der Gehalt an Eiweißstickstoff erreichte bei Erschöpfung des Stickstoffgehaltes der Nährlösung sein Maximum und nahm von da an langsam aber stetig ab. Der Anteil löslicher Stickstoffverbindungen am Gesamtstickstoff der Pflanzen nahm bis zum 25. Kulturtag ab und dann wieder zu.

Die Kohlenhydratbilanz war bis zum 15. Kulturtag schwach positiv und sank von diesem Zeitpunkt an laufend ab.

Die absorbierte Energie wurde nach Einstellung der Zellteilungen überwiegend in Neutralfetten gespeichert, die bis zu 90% der Lipide erreichten. Der Anteil der Lipide an der Trockensubstanz stieg bis zum 25. Tag der Kultur von 22% auf 70%. Zugleich damit erreichten die Zellen den maximalen Gehalt an Trockensubstanz.

Vom 25. Tag an nahm auch der Fettgehalt wieder ab; der Gehalt der Zellen an organischer Substanz ging wieder zurück.

5. Der Farbstoffgehalt der Zellen nahm vom Zeitpunkt der Einstellung der Zellenvermehrung an laufend ab. Durch Gegenüberstellung der Extinktionsspektren der Algen und ihrer Farbstoffauszüge zu Beginn und am Schluß der Kultur wurden die eingetretenen Änderungen charakterisiert.

6. Die Zusammensetzung und Vermehrung von *Chlorella pyrenoidosa* in Abhängigkeit der von der Einzelzelle absorbierten Strahlungsleistung wurde untersucht.

Dabei erwies sich u. a. der Eiweißgehalt der gebildeten organischen Substanz von der absorbierten Lichtleistung abhängig.

Erhöhung des Eiweißgehaltes ermöglichte Vervielfachung der Teilungsfrequenz.

7. Chlorellen, die sich täglich zweimal teilten, enthielten sechsmal soviel Eisen, doppelt soviel Asche, anderthalbmal soviel Eiweiß und ein Fünftel an Kohlenhydraten wie solche, die sich in 20 Tagen nur einmal teilten. Der Lipoidgehalt war stets nahezu der gleiche.

8. In Abhängigkeit von der Beleuchtungsstärke wurden 3—6% der absorbierten Lichtenergie als Verbrennungswärmen der organischen Substanz wiedergefunden und 45—90 Mole Quanten zur Synthese der auf 1 Mol Kohlenstoff entfallenden organischen Substanz verbraucht.

9. Aus der Gesamtheit der Ergebnisse konnte ein Schema zur Steuerung von *Chlorellakulturen* auf die gewünschte Zusammensetzung der organischen Substanz entworfen werden.

Herrn Professor Dr. R. HARDER, der das Thema stellte, und Herrn Professor Dr. H. J. DEUTICKE, bin ich für die Förderung dieser Untersuchungen zu großem Dank verpflichtet; auch danke ich Herrn Professor Dr. A. PIRSON, Marburg, für klärende Diskussion zahlreicher Einzelfragen.

Literatur.

- ALBERTS-DIETERT, FR.: *Planta* (Berl.) **32**, 88 (1941). — ARNOLD, W.: A Calorimetric Determination of the Quantum Yield in Photosynthesis; in FRANCK u. LOOMIS. *Photosynthesis in Plants*, Ames, Iowa (1949). — BENSON, A. A., M. CALVIN, V. A. HAAS, S. ARONOFF, A. G. HALL, J. A. BASSHAM and J. W. WEIGL: C^{14} in Photosynthesis; in FRANCK u. LOOMIS, *Photosynthesis in Plants*, Ames, Iowa (1949). — BERNHAUER, K.: *Erg. Enzymforsch.* **9**, 297 (1946). — BLACKMAN, F. F.: *Ann. Bot.* **19**, 281 (1905). — BODE, O.: *Jb. Botanik* **89**, 208 (1941). — BROWN, H. T., u. F. ESCOMB: *Proc. Roy. Soc. Ser. B* **76**, 29, 94 (1903) zitiert n. WILLSTÄTER u. STOLL, *Unters. üb. Assimil. d. Kohlensäure*, Berlin (1918). — BURK, D., u. O. WARBURG: *Naturwiss.* **24**, 560 (1950); *Z. Naturforsch.* **6b**, 12 (1951). — BURSTRÖM, H.: *Naturwiss.* **30**, 645 (1942). — CALVIN, U., u. A. A. BENSON: *Science* (Lancaster, Pa.) **109**, 140 (1949). — DENFFER, D. v.: *Arch. Mikrobiol.* **14**, 159 (1948a); *Biol. Zbl.* **67**, 7 (1948b). — DENK-CZURDA, V.: *Planta* (Berl.) **32**, 630 (1942). — DEUTICKE, H. J., R. HARDER u. H. KATHEN: *Naturwiss.* **36**, 60 (1949). — DIRR, K., u. O. V. SODEN: *Biochem. Z.* **312**, 263 (1942). — DIXON, M., u. K. A. C. ELLIOT: *Biochem. Z.* **24**, 820 (1930). — EICHHOFF, H. H.: *Biochem. Z.* **303**, 112 (1939). — EMERSON, R., u. C. M. LEWIS: *Amer. J. Bot.* **28**, 789 (1941). — FINK, H., H. HAEHN u. W. HOERBURGER: *Forschungsdienst* **5**, 115 (1938). — GAFFRON, H.: *Biol. Zbl.* **59**, 302 (1939). — GERDES, G.: *Arch. Mikrobiol.* **16**, 55 (1951). — HAAS, M.: *Zur Kenntnis von Pediastrum Boryanum*. Diss. Stuttgart (1932). — HARDER, R.: *Z. Bot.* **15**, 305 (1923). — HARDER, R., W. SIMONIS u. O. BODE: *Nachr. Ges. Wiss. Göttingen* **VI**, 3, 135 (1938). — HARDER, R., u. H. v. WITSCH: *Forschungsdienst Sonderheft* **16** (1942a); *Ber. dtsh. bot. Ges.* **60**, 146 (1942b). — HEATH, O. V. S., u. F. G. GREGORY: *Ann. Bot. N. S.* **2**, 811 (1938). — HEIDE, S.: *Arch. Mikrobiol.* **10**, 135 (1939). — IGGENA, M. L.: *Arch. Mikrobiol.* **9**, 123 (1938). — KATHEN, H.: *Arch. Mikrobiol.* **14**, 602 (1949). — KETCHUM, B. H., u. A. C. REDFIELD: *Biol. Bull.* **75**, 165 (1938). — KETCHUM, B. H., L. LILLY u. A. C. REDFIELD: *Cell. and Comp. Physiol.* **33**, 267 (1949). — LIEBICH, H.: *Z. Bot.* **37**, 123 (1942). — LINDNER, P.: (Reichsausschuß für pflanzliche und tier. Fette und Öle, Berlin) *Patentschrift* Nr. 320560 (1917). — LOESCHKE, H. H., u. R. WEVER: *Pflügers Arch.* **253**, 533 (1951). — LOHMANN, K., u. L. JENDASSIK: *Biochem. Z.* **178**, 419 (1923). — MA, T. S., u. G. ZUAZAGA: *Ind. Eng. Chem.* **14**, 280 (1942). — MENKE, W., u. E. JAKOB: *Z. physiol. Chem.* **272**, 227 (1942). — MILNER, H. W.: *J. of Biol. Chem.* **176**, 813 (1948). — MÜLLER, FR.: *Blutkörperchenzählung*. Abderhaldens Handb. d. biol. Arbeitsmeth. **VI**, 3 (1923). — MYERS, J.: *J. Gen. Physiol.* **29**, 419 (1946a); **29**, 429 (1946b); *The Pattern of Photosynthesis in Chlorella*; in FRANCK u. LOOMIS, *Photosynthesis in Plants*, Ames, Iowa (1949). — MYERS, J., u. L. B. CLARK: *J. Gen. Physiol.* **28**, 103 (1944). — MYERS, J., u. J. A. JOHNSTON: *Plant Physiol.* **24**, 111 (1949). — MYERS, J., J. N. PHILLIPS, u. J. R. GRAHAM: *Plant Physiol.* **26**, 539 (1951). — NODDACK, W., u. H. J. EICHHOFF: *Z. physik. Chem. A* **185**, 241 (1939). — PASCHER, A.: *Chlorophyceen*. Süßwasserflora, G. Fischer, Jena (1915). — PEARSALL, W. H., u. F. G. FOGG: *Food Science Abstr.* **23**, 11 (1951). — PIRSCHLE, J., u. F. v. WETTSTEIN: *Biol. Zbl.* **60**, 626 (1940). — PIRSON, A.: *Z. Bot.* **31**, 193 (1937). — PIRSON, A., u. G. WILHELM: *Z. Naturforsch.* **5b**, 211 (1950). — POHL, R. W.: *Einführung in die Optik*, 8. Aufl. Berlin: Springer 1948. — PRATT, R.: *Amer. J. Bot.* **27**, 52 (1940); **30**, 32 (1943). — PRATT, R., u. J. FONG: *Amer. J. Bot.* **27**, 431 (1940). — REIN, H.: *Einführung in die Physiologie des Menschen*. Berlin: Springer 1948. — REINARTZ, F., u. H. LAFOS: *Angew. Chem.* **62**, 572 (1950). — RIEKE, F. F.: *Quantum Efficiencies for Photosynthesis and Photoreduction in Green Plants*; in FRANCK u. LOOMIS. *Photosynthesis in Plants*, Ames, Iowa (1939). — RIPPEL, A.: *Arch. Mikrobiol.* **11**, 271 (1940). — ROHDE, W.: *Symb. Bot. Ups.* **10**, 1 (1948). — SAGROMSKY, H.:

Planta (Berl.) **33**, 299 (1942). — SCHENK, FR.: Pflügers Arch. **47**, 621 (1890); **55**, 203 (1894). — SCOTT, C. T.: Cell. and Comp. Physiol. **21**, 327 (1943). — SEYBOLD, A., u. K. EGLE: Jb. wiss. Bot. **86**, 50 (1938). — SEYBOLD, A., H. MEHNER u. H. BÜHLER: Biol. Zbl. **69**, 229 (1950). — SEYBOLD, A., u. A. WEISSWEILER: Bot. Arch. **43**, 252 (1942); **44**, 102 (1943). — SIMONIS, W.: Planta (Berl.) **29**, 129 (1939); **35**, 188 (1947). — SMITH, J. H. C.: Plant Physiol. **19**, 394 (1944). — SPOEHR, H. A.: Proc. Amer. Philosoph. Soc. **95**, 64 (1951). — SPOEHR, H. A., u. H. W. MILNER: Plant Physiol. **24**, 120 (1949). — SPOEHR, H. A., J. H. C. SMITH, H. H. STRAIN, H. W. MILNER u. G. J. HARDIN: Carnegie Inst. Washington Publ. 586 (1949). — STEGMANN, G.: Z. Botan. **35**, 385 (1940). — STEINER, M.: Ber. dtsch. bot. Ges. **56**, 73 (1938). — STRAIN, H. H.: Manual of Phycology. Waltham, Mass., Chronica Botanica C. 1949. — THIEL, A.: Absolutkolometrie. Berlin: de Gruyter 1939. — TISCHER, J.: Z. physiol. Chem. **281**, 143 (1944). — TRAPPE, W.: Biochem. Z. **305**, 150 (1940). — USPENSKI, E. E., u. W. J. USPENSKAJA: Z. Bot. **17**, 273 (1925). — WARBURG, O.: Biochem. Z. **100**, 230 (1919). — WARBURG, O., u. O. GELEICK: Z. Naturforschg. **6a**, 134 (1951). — WARBURG, O., H. GELEICK, u. K. BRIESE: Z. Naturforschg. **6a**, 285 (1951). — WARBURG, O., u. E. NEGELEIN: Biochem. Z. **110**, 66 (1920). — Z. physik. Chem. **102**, 135 (1922); **106**, 191 (1923). — WEISS, H.: Naturwiss. Rdsch. **3**, 225 (1950). — WHITE u. WERKMAN: Arch. Biochem. **17**, 475 (1948). — WINDAUS, A.: Z. physiol. Chem. **65**, 110 (1910). — WINOKUR, M.: Amer. J. Bot. **35**, 118 (1948). — WITSCH, H. v.: Naturwiss. **33**, 221 (1946); Biol. Zbl. **67**, 95 (1948a); Arch. Mikrobiol. **14**, 128 (1948b).

(Aus dem Institut für Pflanzenzüchtung Quedlinburg
der Deutschen Akademie der Landwirtschaftswissenschaften.)

Dauerorganbildung bei *Rozella allomycis* Foust, ein Beitrag zur Kenntnis der Sexualität der niederen Phycomyceten.

Von

GEORG SÖRGEL.

Mit 5 Textabbildungen.

(Eingegangen am 1. April 1952.)

Über die Sexualität der eingeißeligen holokarpen niederen Phycomyceten ist noch recht wenig bekannt. Während bei den *Achlyogetonaceen* mit Sicherheit noch keinerlei Geschlechtsgvorgänge beobachtet werden konnten, zeichnen sich sowohl die *Olpidiaceen* als auch die *Synchytriaceen* dadurch aus, daß ihre Schwärmer unter gewissen Umständen miteinander kopulieren können. Die gebildeten Planozygoten lassen ihren Inhalt nach dem Festsetzen auf ihnen zusagenden Wirtszellen in diese übertreten und bilden schließlich Dauerorgane aus. Daneben scheint aber bei gewissen Formen noch eine andere Art der Vereinigung geschlechtsverschiedener Individuen vorzukommen. So verschmelzen nach SCHWARTZ und COOK (1928) bei *Olpidium radicale* nackte Protoplasten im Innern der Wirtspflanze.

Das Zustandekommen von Kopulationen — und damit die Bildung von Dauerorganen — läßt sich in vielen Fällen darauf zurückführen, daß überalterte „Zoosporen“ sich wie Gameten verhalten. In anderen Fällen sollen aber die Dauerorgane infolge ungünstiger Außenbedingungen entstehen, ohne daß Sexualität dabei mit im Spiele ist. Auch für *Rozella allomycis*, einem Vertreter der *Olpidiaceen*, werden von FOUST (1937) nur Außenfaktoren für ihre Entstehung verantwortlich gemacht. Sexualität wurde bei diesem Pilz bisher nicht beobachtet.

Auf Stubenfliegen, die bei Untersuchungen über das Auftreten von niederen Pilzen im Erdboden als Köder dienten (SÖRGEL, 1941), traten neben vielen unbefallenen *Allomycesmycelien* auch solche auf, in denen *Rozella allomycis* vorhanden war. Für die nachstehenden Untersuchungen wurden vier Herkünfte verwendet. Das Ausgangsmaterial dazu stammt aus dem Pflanzenphysiologischen Institut in Göttingen. Zwei der Erdproben stammen aus Mexiko (vom unteren Rio Panuco und aus der Umgebung von Veracruz), die dritte wurde aus einer Erde von La Libertad in Salvador isoliert, während die vierte in einer Erde aus Manila vorhanden war. Durch Hinzugeben befallener Mycelien zu auf Fliegen kultivierten *Allomyces*individuen ließen sich die befallenen *Allomyces*-Stämme

als Rohkulturen leicht vermehren. Während an den *Rozellen* von den Standorten 1, 3 und 4 keine morphologischen Unterschiede festzustellen waren, wich die Herkunft 2 deutlich durch ihre hellbraunen und mit längeren spitzeren Stacheln versehenen Dauerorgane ab. Diese seit mehr als 10 Jahren konstant gebliebene Form sei als var. *pallida* bezeichnet.

Zum besseren Verständnis sei der Pilz kurz beschrieben. Die Keimung der Dauerorgane¹ vollzieht sich in der Weise, daß nach allerdings am lebenden Objekt infolge der dunkelgefärbten Membran nicht leicht zu verfolgenden Vorgängen im Innern Schwärmer gebildet werden, die durch eine Öffnungspapille nach außen entlassen werden (Abb. 1).

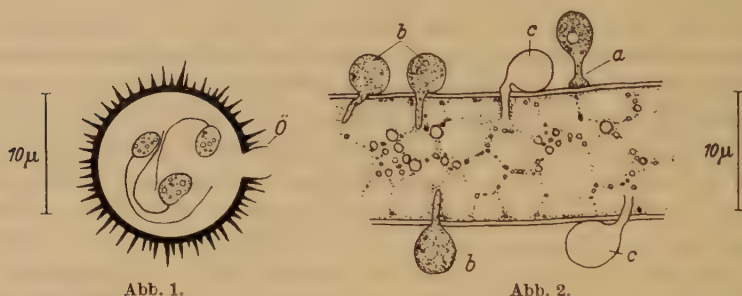


Abb. 1.

Abb. 2.

Abb. 1. Optischer Schnitt durch ein gekeimtes Dauerorgan von *Rozella allomyces* var. *pallida* mit Öffnungspapille (Ö) und drei noch nicht ausgeschlüpften Schwärmern.

Abb. 2. Infektionsstadien der Schwärmer von *Rozella allomyces* auf einer Hyphe von *Allomyces arbuscula* var. *arbuscula*. Bei a ist ein Appressorium gebildet, bei b sind die Keimschläuche ins Innere eingedrungen und bei c sind die Sporen entleert.

Die Schwärmer sind in der Regel eingeißelig; die mehrfach aufgetretenen zwei- und mehrgeißeligen stellen Ausnahmen dar. Nach kurzer Schwärmzeit, die durch amöboides Umherkriechen unterbrochen werden kann, setzen sie sich auf *Allomyces*hyphen bzw. -Fortpflanzungsorganen fest, runden sich ab, ziehen ihre Geißel ein und umgeben sich mit einer festen Membran. Kurz danach wird an oder in der Nähe der Berührungsstelle der unbeweglich gewordenen Spore mit der Hyphe ein Keimschlauch in Gestalt eines Auswuchses sichtbar. Es kommt aber bisweilen vor, daß die Schwärmer, wenn sie in der Nähe der Hyphen zur Ruhe gekommen sind, schon in geringer Entfernung von diesen zu keimen beginnen. In solchen Fällen wird dieser Schlauch dann mehr oder weniger lang; als Extremfall wurde ein solcher von der 7fachen Länge des eigentlichen Sporenkörpers gesehen. Ist dies der Fall, wird in den meisten Fällen beim Auftreffen auf die Wirtshyphe ein Appressorium gebildet (vgl. Abb. 2, a). Nicht so klar tritt dieses in Erscheinung, wenn

¹ Sie bleiben sehr lange keimfähig — sowohl bei Aufbewahrung in trockener Erde als auch in Leitungswasser auf Fliegen keimten sie noch gut nach 12 Jahren.

von vornherein ein Kontakt mit der Hyphe vorhanden ist. Nachdem die Hyphenwand durchdrungen ist, tritt der Sporenhalt in das Wirtspasma über. Die leeren Sporenhüllen bleiben noch lange erhalten (vgl. Abb. 2, c). Vom Parasiten ist im Innern zunächst nur wenig festzustellen. Lediglich einige, nicht ganz gleichmäßig gestaltete, durch ihr anderes Lichtbrechungsvermögen auffallende Teilchen, die in nicht infizierten Hyphen fehlen, lassen auf sein Vorhandensein schließen. Hinzu kommt außerdem, daß vom heranwachsenden parasitischen Plasma offensichtlich ein Reiz ausgeht, der einmal wachstumsbeschleunigend auf den Wirt wirkt und zum anderen schwache Hypertrophien verursacht. Besonders deutlich wird dieser Einfluß in den Fällen, in denen Mycelien befallen werden, die ihr Wachstum ganz oder nahezu ganz eingestellt hatten. Die Hyphenenden wachsen dann erneut aus, wobei das Plasma dunkler und dichter wird, als es in den parasitenfreien Hyphen ist. *Allomyces* beginnt, so scheint es, noch einmal mit der Bildung von Fortpflanzungsorganen. Die Hyphenenden schwellen tonnenförmig an und gliedern sich vom übrigen Mycel durch eine Querwand ab. Diese Wandbildung bleibt meist nicht auf das Hyphenende beschränkt, sondern geht in basipetaler Richtung weiter, so daß Ketten von hintereinander liegenden Abschnitten entstehen. Bei einem Vergleich mit Sporangien nicht befallener *Allomyces*-pflanzen läßt sich jedoch ein wesentlicher Unterschied zu diesen feststellen. In diesen „Sporangien“ können nämlich weitere Wände entstehen, die entweder von Außenwand zu Außenwand laufen und dabei häufig nicht senkrecht auftreten oder von einer Außenwand zu einer bereits gebildeten Zwischenwand ziehen (siehe Abb. 3, Endzellen). Dadurch wird ein sporangienähnlicher Behälter in mehrere kleinere Teile zerlegt, deren Wände aber deutlich dünner als die Außenwände sind. Die Ausbildung dieser sekundären Wände kann aber auch vollkommen unterbleiben.

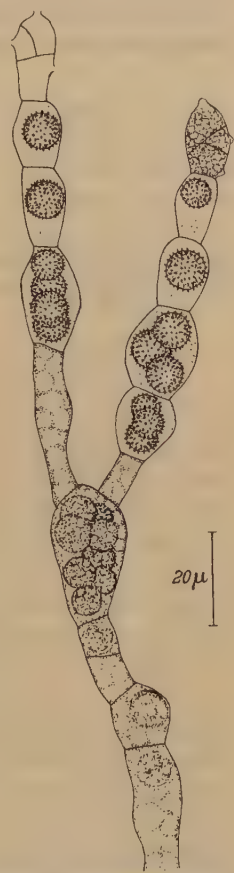


Abb. 3. Von *Rozella allomyces* befallene Hyphe von *Allomyces arbuscula* var. *arbuscula*. Erklärung im Text.

In diesen so entstandenen Organen — seien sie nun mit Sekundärwänden versehen oder nicht — entstehen sehr viele Schwärmer, die wesentlich kleiner als *Allomyces*-Schwärmer sind. Durch winzige Öffnungspapillen gelangen sie ins Freie (Abb. 4). Diese Schwärmer verhalten

sich genau so wie die eingangs beschriebenen aus Dauerorganen. Diese zweite Form der Fortpflanzungsorgane bildet sich im allgemeinen in den Abschnitten, in denen keine Sekundärwände aufgetreten sind, und zwar ebenfalls in basipetaler Folge.

In Abb. 3 ist eine Endverzweigung von befallenem *Allomyces* mycel abgebildet. Während im Endabschnitt der linken Hyphe die Schwärmer bereits entlassen sind, ist ihre Bildung an der Spitze der rechten Hyphe noch nicht abgeschlossen. In den weiter zurückliegenden Teilen sind teils ältere, typisch bestachelte Dauerorgane, teils noch in Bildung begriffene jüngere vorhanden.

In den Rohkulturen, die zunächst nur vorlagen, traten diese leicht zu erkennenden Dauerorgane in großer Menge auf, und es hatte ganz den Anschein, als ob in jungen Kulturen zuerst nur Schwärmsporen bildende Behälter ausgebildet würden, dagegen viel später, nach gewisser Erschöpfung der Nahrungsquelle, Dauerorgane in Überzahl auftraten. Schon makroskopisch war ihr Vorhandensein leicht an der braunen bis schwarzbraunen Farbe der sie enthaltenden *Allomyces* hyphen zu erkennen.

Um die Frage nach der Abhängigkeit der Organbildung von Außenbedingungen einwandfrei klären zu können, waren Reinkulturen erforderlich. Solche sind aber bei einem obligaten Parasiten nicht ohne weiteres herzustellen. Jedoch gelingt es, Doppelreinkulturen zu bekommen, indem man die Eigenheit des Parasiten, sich von der Infektionsstelle aus in den Hyphen (als Plasmodium?) weiter zu verbreiten, ausnutzt. Dazu wurden kurze Stücke von befallenen *Allomyces* hyphen auf einen geeigneten Nährboden gebracht. Fast stets bildeten solche Hyphen neue Verzweigungen aus. Diese wuchsen zum Teil auch in den Nährboden hinein. Durch Umklappen der Agarplatte konnte durch den Nährboden hindurchgewachsenes bakterienfreies Mycel abgeimpft werden. In den meisten Fällen war der Parasit noch im Innern solcher Hyphen vorhanden. Dies zeigte sich vor allem in bald einsetzender reichlicher Schwärmerbildung. Derartige Kulturen

zweier Organismen lassen sich ohne weiteres abimpfen, obwohl es immer wieder vorkommt, daß parasitenfreie Sektoren entstehen. In ähnlicher Weise wurden im übrigen auch die „two-membered cultures“ von COUCH (1939) bei *Woronina polycystis* in *Achlya flagellata* und von EMERSON (1950) ebenfalls bei unserem Pilz und bei *Rozella achlyae* erhalten.

In solchen Doppelreinkulturen wurden ziemlich unabhängig von der Art des Nährbodens, sofern er nur der Entwicklung von *Allomyces* günstig war, stets in großer Menge Schwärmer gebildet. In einem Punkt

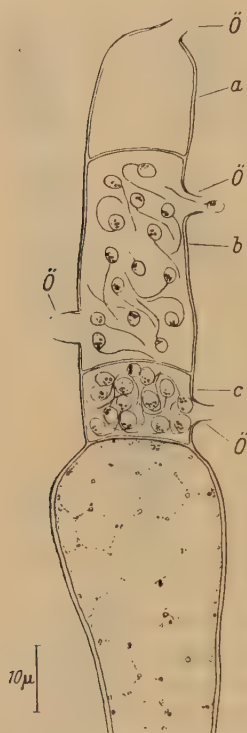


Abb. 4. Reife Schwärmsporenbehälter an einer *Allomyces* hyphe. Der Behälter *a* ist bereits entleert, bei *b* ist das Ausschlüpfen schon weit fortgeschritten und bei *c* hat es erst begonnen.
Ö = Öffnungspapillen.

aber unterschieden sich solche Kulturen auffällig von den Rohkulturen: Dauerorgane wurden nicht ausgebildet. Dieser merkwürdigen Tatsache wurde weiter nachgegangen.

Das Alter der Kulturen schien ohne Einfluß auf die Art der gebildeten Organe zu sein, da auch bis zum Eintrocknen des mit Agar verfestigten Nährbodens aufgehobene Kulturen niemals zur Dauerorganbildung kamen.

Wurde *Allomycesmycel*, welches auf Fliegen kultiviert war, in den verschiedensten Entwicklungsstadien durch Hinzugeben von in Schwärmerbildung befindlichen Hyphenstückchen infiziert, so entstanden nach der Infektion in den neu gebildeten Behältern zwar immer wieder in großer Zahl Schwärmer, aber keine Dauerorgane. Selbst nach mehrmonatiger Beobachtung — teils mit dazwischengeschaltetem abermaligen Hinzufügen neuer Fliegen — gelang es nicht, den Pilz zur Dauerorganbildung zu bringen.

Auch der Temperatureinfluß konnte nicht von großer Bedeutung sein, wie eine bei 18, 20, 24, 28 und 34° angesetzte Kulturserie ergab.

Eine unterschiedliche Resistenz verschiedener *Allomyces*arten, die auf bestimmten Formen wohl Schwärmerbildung, nicht aber Dauerorganbildung erlaubte, konnte auch nicht vorliegen, wie Versuche ergaben, bei denen *Rozella* auf andere Arten übertragen wurde. Als Wirt ließen sich ohne Schwierigkeiten folgende Arten bzw. Varietäten nehmen: *Allomyces arbuscula* var. *arbuscula* und var. *minor*, *A. javanicus* var. *javanicus*, var. *perandrus* und var. *japonensis*, *A. moniliformis* und *A. cystogenes*. Gute Entwicklung und reichliche Schwärmerbildung waren für den Parasiten auf all diesen Arten möglich, ohne daß jemals ein Dauerorgan auftrat.

Schließlich ist noch zu erwähnen, daß sich *Rozella* sowohl auf Gametophyten als auch Sporophyten des Wirtes gleich verhielt. Alle vier erwähnten Herkünfte verhielten sich in dieser Beziehung im übrigen übereinstimmend.

Die Ausbildung der Dauerorgane konnte also nicht oder zum mindesten nicht ausschlaggebend von Außenbedingungen abhängen, sondern ihre Bildung mußte aus anderen Gründen erloschen sein.

Einen Hinweis auf „innere“ Bedingungen ergab eine Versuchsserie, bei der als weitere Modifikation infizierte Mycelien derselben Herkunft, die aber teils gleichzeitig, teils zu verschiedenen Zeiten rein- und getrennt weiterkultiviert worden waren, als Gemisch auf ein und dieselbe Impfstelle einer Agarplatte übertragen wurden. In vielen Fällen zeigte sich das bereits bekannte Bild: In den Hyphen entwickelten sich ausschließlich Schwärmsporen des Parasiten. In anderen Fällen traten aber außerdem noch Dauerorgane auf. Diese unterschieden sich in nichts von denen, die in den Rohkulturen entstanden.

Nachdem dies gefunden worden war, wurden systematisch je zwei von sämtlichen Reinkulturen — von jeder Herkunft waren zahlreiche angelegt worden — miteinander kombiniert. Dabei wurde so vorgegangen, daß die Kulturschale zunächst mit infizierten Hyphen des einen zu prüfenden Stammes beimpft wurde. Von einem anderen Stamm gleichen Alters, bei dem aber lebhaft Schwärmerbildung zu beobachten war, wurden mit Hilfe einer sterilen Glascapillare Schwärmer herausgefangen und auf die gleiche Impfstelle übertragen. Wohl wurden in dem sich ausbreitenden *Allomycesmycel* nach kurzer Zeit viele Schwärmer gebildet, doch waren bei bestimmten Kombinationen und nur bei diesen nach 2 bis 3 Tagen die Hyphen ganz mit Dauerorganen angefüllt. Schließlich nahmen auch diese Kulturen infolge der in Unmenge vorhandenen

Tabelle 1. Kombinationsquadrat für das Auftreten von Dauerorganen (+) von 15 Stämmen von *Rozella allomyces* auf *Allomyces arbuscula* var. *arbuscula*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	—														
2	+	—													
3	—	+	—												
4	+	—	+	—											
5	+	—	+	—	—										
6	—	+	—	+	+	—									
7	—	+	—	+	+	—	—								
8	+	—	+	—	—	+	+	—							
9	+	—	+	—	—	+	+	—	—						
10	+	—	+	—	—	+	—	—	—	—					
11	—	+	—	+	+	—	—	+	+	+	—				
12	—	+	—	+	+	—	—	+	+	+	—	—			
13	—	+	—	+	+	—	—	+	+	+	—	—	—		
14	—	+	—	+	+	—	—	+	+	+	—	—	—	—	
15	—	+	—	+	+	—	—	+	+	+	—	—	—	—	—

Dauerorgane eine dunkle Farbe an. Tab. 1 enthält das Ergebnis eines solchen Kombinationsversuchs, der mit 15 getrennt weiterkultivierten Stämmen der ersten Herkunft aus Mexiko durchgeführt wurde; sie zeigt, daß sich die Stämme 1, 3, 6, 7, 11, 12, 13, 14 und 15 gleich verhalten. Bei einer Kombination dieser Stämme untereinander waren nie Dauerorgane zu erhalten. So oft auch diese Versuche ausgeführt wurden, stets war das Ergebnis das Gleiche. Ebenso verhielten sich die Stämme 2, 4, 5, 8, 9 und 10 unter sich gleich. Bei einer Zusammenimpfung ergaben sie ebenfalls keine Dauerorgane. Wurde aber irgendein Stamm der ersten Gruppe mit irgendeinem Stamm der anderen Gruppe kombiniert, so traten in jedem Fall Dauerorgane auf. Dabei war es nach den ausgeführten Versuchen gleichgültig, unter welchen Außenbedingungen die Kombination erfolgte bzw. die Pilze kultiviert wurden. Inwieweit schon diese Versuche allgemeine Rückschlüsse zulassen, läßt

sich noch nicht ohne weiteres sagen, jedenfalls spricht alles dafür, daß unterschiedliche Außenbedingungen keine oder zumindest keine ins Gewicht fallende Rolle für das Auftreten der Dauerorgane spielen. Entsprechend verhielten sich die anderen Herkünfte. Von der zweiten Herkunft wurden 12, von der dritten und vierten je 18 Stämme miteinander kombiniert. In jedem Fall ließen sich die verschiedenen Stämme in zwei Gruppen einteilen, deren Vertreter unter sich kombiniert nur Organe mit Schwärmern ausbildeten.

Wie lassen sich nun diese Erscheinungen erklären? Nach analogen Verhältnissen bei anderen Pilzen bzw. Algen kann kein Zweifel darüber bestehen, daß bei unserem Pilz zwei geschlechtsverschiedene Stämme gebildet werden. Demnach muß *Rozella allomycis* getrenntgeschlechtlich sein. Ein Geschlecht allein ist nicht in der Lage, Dauerorgane auszubilden, wohl aber unbegrenzt Schwärmer, die immer wieder von neuem einen Befall hervorrufen können. Findet eine Infektion mit beiden Geschlechtern statt, so kommt es zur Bildung von Dauerorganen, die demnach als *Zygoten* bezeichnet werden müssen. Wann es aber zu einer Vereinigung der beiden Geschlechter kommt, ist schwer zu sagen. Ob die Schwärmer miteinander kopulieren können, ließ sich nicht eindeutig entscheiden. Zwar sind die beobachteten Schwärmer meist eingeißelig, es treten aber auch mehrgeißelige auf (Abb. 5). Doch sind letztere vermutlich durch unvollkommene Teilung bei ihrer Bildung entstanden, wie es gelegentlich auch bei anderen Phycomyceten vorkommt. Kopulationsstadien ließen sich nie feststellen.

Es ist eher wahrscheinlich, daß es erst nach dem Eindringen eines andersgeschlechtlichen Schwärmers in eine bereits mit einem Geschlecht befallene Hyphe zur Verschmelzung von Kern und Plasma kommt. In der Natur wird dieser Fall selten verwirklicht sein, und bei einem gleichzeitigen Befall mit beiden Geschlechtern sind die Bedingungen für das Auftreten der Dauerorgane immer gegeben. Es gelingt sogar, ein kleines infiziertes Hyphenstück durch wenige, selbst durch einen einzigen Schwärmer zur Dauerorganbildung zu veranlassen.

Im Widerspruch dazu scheint aber der Befund von FISCHER (1882) zu stehen. der bei *Rozella septigena* mit Einsporinfektionen Dauerorgane erhielt, doch dürfte

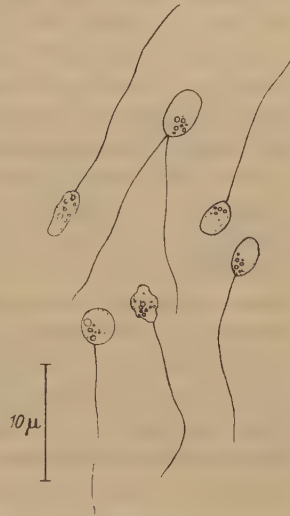


Abb. 5.

Mehrere ausgeschlüpfte Schwärmersporen von *Rozella allomycis*, davon ist eine zweigeißelig, zwei bewegen sich amöboid, eine dritte hat sich abgerundet, während die übrigen beiden noch im Schwärmen begriffen sind.

eine Erklärung dafür darin zu suchen sein, daß er nicht mit Reinkulturen arbeitete. Außerdem gelingt es auch bei der Herstellung von Reinkulturen nicht in jedem Fall, Stämme zu erhalten, die nur Schwärmer ausbilden. Besonders dann, wenn man von längeren Hyphenstückchen ausgeht, erhält man gemischte Stämme, in denen beide Geschlechter vorhanden sind und sofort zur Dauerorganbildung übergehen. Für eine Vereinigung erst innerhalb der Wirtspflanze spricht auch die immer wieder beobachtete Tatsache, daß es bei einer nur an einer Stelle mit wenigen Schwärmern des anderen Geschlechts vollzogenen Infektion nicht lange dauert, bis auch in weiter entfernt liegenden Teilen der Hyphen Dauerorgane auftreten.

Das Verhalten von *Rozella allomycis* läßt sich gut mit den Verhältnissen bei *Olpidium*-arten vergleichen, und seine Zugehörigkeit zu den *Olpidiaceen* wird damit gerechtfertigt. Da die Schwärmer bei *Olpidium* nur unter gewissen Bedingungen miteinander kopulieren, ist zwischen Gameten und Zoosporen kein durchgreifender Unterschied vorhanden. Dieselben Schwärmer dienen dort wie bei unserem Pilz zur ungeschlechtlichen Verbreitung der Art, teils sind sie zur Bildung von Dauerorganen, von Zygoten, befähigt, und man wäre demnach berechtigt, die Behälter, in denen sie gebildet werden, sowohl als Zoosporangien als auch als Gametangien zu bezeichnen. Allerdings scheint auch hier wie bei *Olpidium radicale* erst nach dem Eindringen in den Wirt eine Verschmelzung stattzufinden. Diese Plasmogamie bzw. Karyogamie dürfte aber sehr schnell erfolgen, denn es dauert nur kurze Zeit, bis auch bei einer Infektion mit nur wenigen Schwärmern des anderen Geschlechts die Zygotenbildung in Gang kommt. Dabei muß aber jedes Geschlecht irgendwie seine Selbständigkeit weiter bewahren können, da ohne erneute Infektion — sie läßt sich bei den sich im Agar ausbreitenden Hyphen leicht verhindern — die Bildung von Schwärmern beiderlei Geschlechts neben der Zygotenbildung dauernd weitergeht.

Zusammenfassung.

Bei *Rozella allomycis* entstehen Dauerorgane nur bei Kombination bestimmter Stämme miteinander; dabei spielen Außenbedingungen offenbar nur eine geringe Rolle.

Dieses Verhalten findet seine Erklärung in der Annahme des Bestehens zweier Geschlechter.

Die Dauerorgane dieses getrenntgeschlechtlichen Pilzes stellen demnach Zygoten dar.

Die Schwärmer können sich also wie Zoosporen oder Gameten verhalten, wobei eine Verschmelzung wahrscheinlich jedoch erst nach dem Eindringen in den Wirt stattfindet.

Literatur.

- COUCH, J. H.: J. Elisha Mitchell Sci. Soc. **55**, 208 (1939). — EMERSON, R.: Annual Rev. of Microbiol. **4**, 169 (1950). — FISCHER, A.: Jb. Bot. **13**, 286 (1882). — FOUST, F. K.: J. Elisha Mitchell Sci. Soc. **53**, 197 (1937). — SCHWARTZ, E. J., and W. R. I. COOK: Trans. Brit. Mycol. Soc. **13**, 205 (1928). — SÖRGEL, G.: Beihefte z. Bot. Zbl. **61**, Abt. B, 1 (1941).

(Aus dem Institut für Gärungswissenschaft und Enzymchemie
an der Universität Köln.)

Purinoxydierende Fermente aus Schimmelpilzen.

I. Mitteilung:

Über die Uricase der Schimmelpilze.

Von

WILHELM FRANKE, EZZ-ELDIN M. TAHA und LISELOTTE KRIEG.

Mit 8 Textabbildungen.

(Eingegangen am 15. April 1952.)

Über den Harnsäureabbau durch Pilze ist in der Literatur nur wenig bekannt. MORRIS u. ECKER¹ fanden in harnsäurehaltiger Nährlösung Wachstum und Substratverbrauch durch einige menschenpathogene *Ascomyceten* bzw. *Fungi imperfecti* wie eine *Blastomyces*-Art, *Epidermophyton inguinale*, *Mastigocladium blochi*, *Sporotrichon gougeroti* und *Achorion violaceum*. BRUNEL² hat im Mycelpulver von *Aspergillus niger* Uricase vermißt unter Bedingungen, unter denen Allantoinase und Allantoicase darin nachweisbar waren³.

In höheren Pilzen (*Basidiomyceten*) scheint Uricase nach dem gleichen Autor hingegen ziemlich verbreitet zu sein, ohne daß er hierüber nähere zahlenmäßige Angaben macht⁴. Die gleichzeitig vorhandene Allantoinase führt das angenommene (nicht als solches nachgewiesene) Primärprodukt Allantoin hydrolytisch in Allantoinsäure über. Von einer Allantoicase-Wirkung (die zu Glyoxylsäure und Harnstoff führen würde) ist in der genannten Arbeit nicht die Rede⁵; sie wäre bei der für Allantoinsäure angewandten Bestimmungsmethode, die mit einer sauren Hydrolyse beginnt, auch gar nicht getrennt erfaßt worden.

In ihrer Gesamtheit sprechen die Befunde dafür, daß in Pilzen ähnlich wie in höheren Pflanzen (z. B. Leguminosen^{6,7}), Kaltblütern und vielen Wirbellosen⁸ der Abbau der Harnsäure nach dem umstehenden Schema verläuft⁹:

¹ J. L. MORRIS u. E. E. ECKER: J. Inf. Dis. **34**, 592 (1924).

² A. BRUNEL: Bull. Soc. Chim. biol. Paris **21**, 388 (1939).

³ A. BRUNEL: Bull. Soc. Chim. biol. Paris **21**, 380 (1939).

⁴ A. BRUNEL: Bull. Soc. Chim. biol. Paris **19**, 747 (1937).

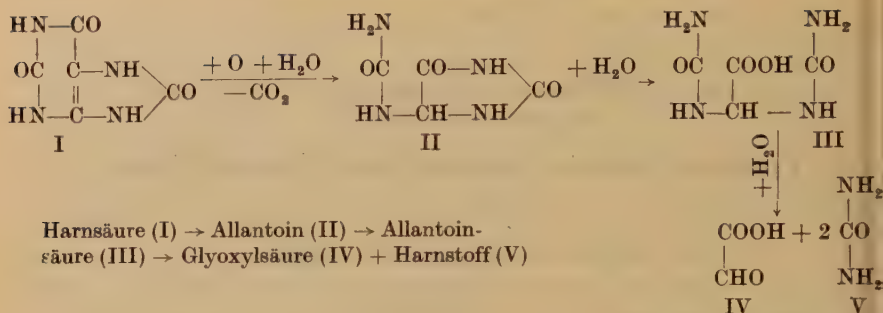
⁵ Sie wurde um diese Zeit erst als isolierte hydrolytische Enzymreaktion erkannt (vgl. A. BRUNEL: Bull. Soc. Chim. biol. Paris **19**, 805 [1937]).

⁶ A. NĚMEC: Biochem. Z. **112**, 286 (1921).

⁷ R. FOSSE, A. BRUNEL u. P. DE GRAEVE: C. r. Acad. Sci. Paris **189**, 716 (1929); **190**, 79 (1930). — R. FOSSE, A. BRUNEL, P. DE GRAEVE, P.-E. THOMAS u. J. SARAZIN: ebenda **191**, 1025 (1930). — R. FOSSE, P. DE GRAEVE u. P.-E. THOMAS: ebenda **194**, 1408 (1932); **195**, 1198 (1932).

⁸ Für Tiere vgl. die neue Zusammenstellung von M. LASKOWSKI in SUMNER-MYRBÄCK: The enzymes I, 946. New York 1951.

⁹ In Gegenwart von Urease schließt sich noch die Harnstoffspaltung zu NH_3 und CO_2 an (vgl. z. B. ^{2,3,6,7}).



Schwer verständlich und daher der Nachprüfung wert erschien dabei BRUNELS Angabe über das Fehlen von Uricase in Schimmelpilzen. Ausgangspunkt unserer eigenen, der Klärung dieser Frage dienenden Untersuchungen war die Prüfung der Harnsäure als Stickstoffquelle für eine Reihe von Schimmelpilzen — dem Phycomyceten *Mucor plumbeus*, den Ascomyceten *Aspergillus fumigatus*, *Asp. niger*, *Penicillium glaucum* und *Pen. glabrum*, den Fungi imperfecti *Alternaria tenuis*, *Fusarium equiseti* und *Fus. nivolum* —, wobei wir bei allen Pilzen mit Ausnahme von *Fus. equiseti* gutes bis sehr gutes Wachstum fanden. Es gelang uns, in wäßrigen Mycelextrakten der Pilze (mit der erwähnten Ausnahme) eine mit Sauerstoff wirksame Uricase nachzuweisen. Fast immer trat das Ferment auch in Mycel, das auf anderen N-Quellen gezüchtet worden war, auf (wenn auch bisweilen in geringerer Aktivität); es ist also im allgemeinen und vorwiegend konstitutiver Natur. Nach weiteren Untersuchungen einer größeren Anzahl von Schimmelpilzen kommt es weit, wenn auch nicht ubiquitär, verbreitet vor, wobei in quantitativer Hinsicht allerdings erhebliche Unterschiede nicht nur zwischen verschiedenen Arten, sondern bisweilen auch zwischen verschiedenen Stämmen derselben Art auftreten.

Die vorliegende I. Mitteilung sollte einen Überblick über die Verhältnisse vermitteln und eine allgemeine Charakteristik der Schimmelpilz-Uricase geben. Der Großteil der Enzymversuche wurde an *Alternaria tenuis*, ein kleinerer an *Aspergillus niger* und *Aspergillus fumigatus* durchgeführt. In 2 folgenden Mitteilungen werden Eigenschaften und Reaktionsprodukte der Uricasen aus *Aspergillus* und *Alternaria* eingehend beschrieben werden. Schon jetzt läßt sich sagen, daß die Schimmelpilz-Uricase sich hinsichtlich ihrer enzymatischen Eigenschaften stark der früher in unserem Arbeitskreis näher untersuchten sog. Glucose-oxydase (genauer -aerodehydase¹⁰) der *Aspergillaceen* nähert.

¹⁰ W. FRANKE u. Mitarb.: Liebigs Ann. **531**, 1 (1937); **541**, 117 (1939); **555**, 111 (1944); **559**, 221 (1948). — Der Trivialname Glucose-oxydase wird, da er sich zur Unterscheidung des Pilzferments von der tierischen Glucose-(anaero)dehydase eingebürgert hat, im folgenden meist beibehalten.

I. Methodik.

1. Pilzkulturen.

Folgende Organismen, die im allgemeinen auf Würze-Agar (die *Alternarien* auf CZAPEK-DOX-Agar) in Stammkultur gehalten wurden, wurden bei unseren Versuchen verwendet. Die eingeklammerte römische Zahl hinter dem Artnamen bezeichnet die Herkunft ¹¹.

a) *Phycomyceten*

Rhizopus nigricans (I)
Mucor plumbeus (I)
Cunninghamella elegans (III)

c) *Fungi imperfecti*

Alternaria tenuis (12 Stämme, davon
 1 0 [Tomate], 1 I, 2 III, 4 VI, 1 VII,
 3 IX)
Alt. tenuissima (IX)
Alt. solani (5 Stämme, davon 1 0 [To-
 mate], 1 IV, 1 V, 2 VI

b) *Ascomyceten*

Aspergillus niger (6 Stämme II)
Asp. glaucus (I)
Asp. fumigatus (2 Stämme II)
Asp. oryzae (II)
Penicillium glaucum (2 Stämme II)
Pen. glabrum (II)
Pen. notatum (2 Stämme III)
Pen. chrysogenum (II)
Gliocladium sp. (III)
Neurospora sitophila (III)

Alt. porri (IX)
Alt. gossypina (IX)
Stemphylium sp. (I)
Botrytis cinerea (III)
Cladosporium sp. (I)
Trichoderma koningi (III)
Fusarium sambucinum (VII)
Fus. niveum (VII)
Fus. semitectum (VII)
Fus. equiseti (VII)

Einige weitere Arten, deren Untersuchung ebenfalls beabsichtigt war, wurden nicht in die Tabelle aufgenommen, da sie auf unserem Standard-Nährboden (CZAPEK-DOX-Lösung) nicht oder nur sehr schlecht angingen. Es waren a) *Phycomyces blakesleeana* (I), *Absidia glauca* (III), b) *Sclerotinia* sp. (III), c) *Oospora lactis* (I), *Alt. brassicae* (IX), *Alt. tenuissima* (1 Stamm IX).

2. Pilzzüchtung.

Es wurden zunächst Vorkulturen in Petrischalen (10 cm Ø) auf CZAPEK-DOX-Agar¹² (bei den *Fungi imperfecti*) oder Würze-Agar (bei den meisten *Phyco-* und *Ascomyceten*) angelegt. Wenn nach mehreren Tagen bei 28° reichliche Konidienbildung eingetreten war, wurden mit einem sterilen Korkbohrer kleine Mycelscheibchen (0,5 cm Ø) ausgestanzt und zur Beimpfung der eigentlichen Kulturgefäße verwendet. Die Züchtung der Pilze in größerem Maßstab erfolgte dann in

¹¹ 0 = Eigenisolierungen (E. M. TAHA). — I = Eigene Institutssammlung. — II = Ehem. Institut für organ.-chem. Technologie und Gärungschemie der Universität Würzburg. — III = Botanisches Institut der Techn. Hochschule Stuttgart. — IV = Botanisches Institut der Techn. Hochschule München. — V = Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen. — VI = Institut für Pflanzenkrankheiten der Universität Bonn. — VII = Botanisches Institut der Fuad-Universität Kairo. — VIII = Imperial Mycological Institute, Kew, Surrey. — IX = Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn. — Herrn Prof. Dr. A. RIPPEL, Göttingen, Prof. Dr. H. BRAUN, Bonn, und Prof. Dr. R. GISTL, München, sind wir für kostenlose Überlassung von *Alternaria*-Stämmen zu Dank verpflichtet.

¹² Vgl. z. B. K. BERNHAUER: Gärungschemisches Praktikum (Berlin 1939) oder A. JANKE, Arbeitsmethoden der Mikrobiologie I (Dresden u. Leipzig 1946).

Petrischalen von 19—23 cm \varnothing (nach Beimpfung mit je 10 Mycelscheibchen) auf CZAPEK-DOX-Lösung, normalerweise mit NaNO_3 als N-Quelle^{12a}. Pro Charge wurden meist 2—3 l Nährlösung verwendet. Die Inkubationszeit bei 28° war 2 Tage bei den Aspergillen, 3 Tage bei den meisten anderen Pilzen, 5 Tage bei *Cladosporium*. Im allgemeinen wurde so lange inkubiert, bis eine zusammenhängende Myceldecke ohne stärkere Konidienbildung entstanden war. (Bisweilen trat submerse Mycelbildung ein, so besonders bei *Alt. solani* und *Alt. porri*.) Anschließend wurden die Mycelien zwecks Verarmung an Eigensubstraten noch eine Nacht auf Leitungswasser gesetzt, am nächsten Morgen gewaschen und in der Handpresse bis zum Trockengewicht 15—20% abgepreßt.

3. Herstellung von Enzymlösungen.

Das mit der Schere zerkleinerte Preßmycel — je 1 Nährlösung meist 35 bis 40 g — wurde mit dem gleichen Gewicht Seesand etwa 10 min und nach Zugabe des doppelten Volumens Wasser nochmals 10 min in einer Reibschale gründlich verrieben. Anschließend wurde 10 min bei 3—4000 U/min zentrifugiert, wodurch gelbliche bis bräunliche, ziemlich stark getrübbte Fermentlösungen erhalten wurden, die in Eis oder im Eisschrank aufbewahrt wurden. Die Bestimmung ihrer Aktivität erfolgte regelmäßig noch am gleichen Tage, bei genaueren Versuchen in Reihen abgestufter Konzentration (0,25—2,0 cm³ im 5 cm³-Ansatz, vgl. S. 275), bei orientierenden mit 2 cm³ Lösung. Die Enzymlösungen können ohne größeren Aktivitätsverlust aber auch 1—2 Tage im Eisschrank aufbewahrt werden; allerdings pflegt ihre Eigenatmung dabei anzusteigen.

Bei den meisten orientierenden Versuchen dieser Arbeit wurde auf eine Dialyse der Fermentlösungen im allgemeinen verzichtet, obwohl diese 1 bis höchstens 2 Tage gegen fließendes Leitungswasser ohne größeren Enzymverlust durchgeführt werden kann. Bei Rohextrakten beziehen sich auch die angegebenen Trockengewichte (bei 105—110° erhalten) auf undialysierte Lösungen. Bei gereinigten Enzymlösungen wurde zur Trockengewichtsbestimmung 2 Tage dialysiert. Bei der Dialyse reduziert sich das Trockengewicht auf 30—45% (im Mittel 37%) von dem der Rohextrakte; entsprechend steigt die „spezifische Aktivität“ (Q_{02} s. u.) auf das 2,2—3,3fache.

4. Prüfung der Wirksamkeit.

a) O_2 -Versuche. Die Prüfung von Fermentlösungen auf ihre Aktivität erfolgte im allgemeinen im sog. „Normalansatz“ bei 30° unter Luft im WARBURG-Apparat. Dieser Ansatz enthielt in 5 cm³ Gesamtvolumen 0,25—2,0 cm³ Fermentlösung, 1,0 cm³ m/5-Phosphatpuffer p_H 7,0, 1,0 cm³ m/50-Lithium-urat, H_2O auf 5,0 cm³.

Die durch Zugabe umkristallisierter Harnsäure¹³ zu kochendem n/10-LiOH und Verdünnen erhaltene primäre Lithiumurat-Lösung wurde stets frisch bereitet und nicht länger als einen Tag verwendet¹⁴.

^{12a} Als C-Quelle wurde — von den Versuchen der Tab. I mit variiertem N-Quelle abgesehen — stets technische Glucose (Stärke Zucker) verwendet, die (wohl wegen ihres Gehalts an Spurenelementen u. dgl.) besseres Mycelwachstum ergab als reine Glucose.

¹³ Herrn Prof. Dr. H. BREDERECK, T. H. Stuttgart, danken wir für die Überlassung der in Deutschland bis vor kurzem noch nicht wieder hergestellten Harnsäure (PFANSTIEHL-U.S.A.).

¹⁴ Auch bei Aufbewahrung im Eisschrank nimmt der Gehalt allmählich ab, die Autoxydabilität erheblich zu. Gelbstichige Präparate zeigen schon in frischer Lösung beträchtliche Autoxydation. [(Vgl. A. IONESCO MATIU u. A. POPESCO, Bull. Soc. Chim. biol. Paris **21**, 264 (1939).]

Der Mittelstutzen der WARBURG-Gefäße enthielt 0,2 cm³ 2 n-NaOH auf Filtrierpapier zur Absorption von CO₂.

Die Aktivität von Fermentlösungen wird im folgenden meist in Form der „Atmungsgröße“

$$Q_{O_2} = \frac{\text{mm}^3 O_2}{\text{mg Enzymtrockengew.} \times \text{Std}}$$

angegeben. Bisweilen findet sich auch die Angabe der um die Eigenatmung der Enzymlösung (q_{O_2}) korrigierten Atmungsgröße ($Q_{O_2} - q_{O_2}$). Der Berechnung wird in jedem Falle die Anfangsgeschwindigkeit, d. h. die O₂-Aufnahme in den ersten 15 min, zugrunde gelegt.

b) *Anaerobe Versuche* wurden gleichfalls bei 30° mit Methylenblau oder 2,6-Dichlorphenol-indophenol (TILLMANS' Reagens) nach der THUNBERG-Methodik durchgeführt. Die Einstellung der Farbstofflösungen auf gleichen Gehalt erfolgte mit n/100-TiCl₃¹⁵, beim (unbeständigen) Indophenol einfacher jodometrisch¹⁶. Die Ansätze entsprachen im wesentlichen dem aeroben „Normalansatz“, jedoch war das Gesamtvolumen auf 4,0 cm³ reduziert. Neben der Entfärbungszeit t im kompletten Ansatz wurde stets auch die Entfärbungszeit t_0 im substratfreien Ansatz (der „Enzymeigenatmung“ entsprechend) mitbestimmt.

5. Harnsäurebestimmung.

In einer Reihe von Fällen wurde die Abnahme der Harnsäure colorimetrisch, später photometrisch (im LEITZ-Kompensationsphotometer mit Filter 620) nach der sehr empfindlichen Methode von FOLIN u. WU¹⁷ in einer neueren Modifikation von BLAUCH u. KOCH¹⁸ bestimmt. Hierbei wurden zu 0,25—1,0 cm³ Reaktionslösung 5 cm³ einer Harnstoff-KCN-Lösung (25- bzw. 2,5%ig) und hierauf 1 cm³ einer 34%igen Phosphorwolframsäure-Lösung gegeben. Die sich (durch Reduktion) entwickelnde Blaufärbung wird nach wenigstens 20 min mit derjenigen einer Reihe von Teströhrchen bekannten Harnsäuregehalts (bei gleichem Enzymgehalt) verglichen oder an Hand einer zuvor aufgenommenen photometrischen Eichkurve ausgewertet. Enthalten auch die dabei verwendeten Harnsäurelösungen Enzym, so kann auf die (an sich vorgeschriebene) Enteiweißung verzichtet werden. Wegen der bei höheren Harnsäure-Konzentrationen auftretenden Abflachung der Eichkurve wird zweckmäßig im Bereich zwischen 0,025 und 0,2 mg Harnsäure gearbeitet.

6. Allantoinbestimmung.

Zum zunächst qualitativen Nachweis von Allantoin verwendeten wir die empfindliche Farbreaktion von FOSSE u. BOSSUYT¹⁹, bei der zuerst alkalisch zu Allantoin-säure und hierauf sauer zu Harnstoff und Glyoxylsäure aufgespalten wird, deren Phenylhydrazon bei Oxydation mit K₃FeCy₆ eine intensive Rotfärbung liefert. Bei leichter Modifikation der Originalvorschrift konnte das Verfahren auch zu einer annähernd quantitativen Bestimmung von Allantoin verwendet werden (vgl. auch ^{20, 21}).

¹⁵ J. M. KOLTHOFF: Die Maßanalyse II, 55 (Berlin 1928).

¹⁶ E. SCHILD u. M. v. HUYMANN: Brauwissensch. 1951, 49.

¹⁷ O. FOLIN u. H. WU: J. of Biol. Chem. 38, 101 (1919).

¹⁸ M. B. BLAUCH u. F. C. KOCH: J. of Biol. Chem. 130, 443, 455 (1940).

¹⁹ R. FOSSE u. V. BOSSUYT: C. r. Acad. Sci. Paris 188, 106 (1929).

²⁰ K. RO: J. Biochem. (Jap.) 14, 391 (1932).

²¹ M. FLORKIN u. G. DUCHATEAU-BOSSON: Enzymol. 9, 5 (1940). Exakter, aber

langwieriger ist das Verfahren, bei dem die primäre Hydrolyse zu Allantoinsäure enzymatisch (mit einem Soja-Präparat 12 Std bei 40°) vorgenommen wird.

Tabelle 1. Wachstumsintensität von Schimmelpilzen in Abhängigkeit von der Stickstoffquelle.

Es bedeutet: 0 = kein Wachstum; + = schlechtes W.; ++ = mäßiges W.; +++ = gutes W.; ++++ = sehr gutes W. Im allgemeinen stimmen die (relativen) Wachstumsstufen nach 3 und 5 Tagen überein. Wo dies nicht der Fall war, ist dies durch Klammern angegeben; so bedeutet ++(+) mäßiges Wachstum nach 3, gutes nach 5 Tagen.

N-Quelle Organismus	NaNO ₃	NH ₄ NO ₃	(NH ₄) ₂ SO ₄	Asparagin	Glutaminsäure	Pepton	Harnstoff	Harnsäure
<i>Mucor plumbeus</i>	++	+	+	++(+)	+	+	+	+
<i>Asp. fumigatus</i>	++	+	++	++	+	+	+	+
<i>Asp. niger</i>	++	+	++	++	+	+	+	+
<i>Pen. glaucum</i>	++	++	++(+)	++	+	+	+	+
<i>Pen. glabrum</i>	++	++	++	++	+	++(+)	+	++
<i>Alt. tenuis</i>	++	++	++	++	+	++	++	++
<i>Fus. equiseti</i>	++	++	++	++	+	++	++	0
<i>Fus. nivium</i>	++	++	++(+)	++	+	++	++	++

Hierzu werden 0,05—0,5 cm³ Reaktionslösung mit Wasser auf 1 cm³ aufgefüllt, mit 3 Tropfen 2-n NaOH versetzt und 10 min im kochenden Wasserbad gehalten. Hierauf wird mit 2 n-HCl gegen Phenolphthalein neutralisiert, 1 Tropfen HCl im Überschuß zugegeben und wieder 2 min wie oben erhitzt. Auf Zusatz von 6 Tropfen frisch bereiteter 0,5%iger Phenylhydrazinhydrochlorid-Lösung und (nach dem Abkühlen) von 2 Tropfen 5%iger K₃FeCy₆-Lösung + 1,5 cm³ konz. HCl tritt Rotfärbung auf, die unter Verwendung des Filters 530 photometriert wird. Die Auswertung erfolgt auch hier an Hand einer (in Enzymgegenwart aufgenommenen) Eichkurve.

Die Methode ist am empfindlichsten im Bereich zwischen 0,02 und 0,1 mg Allantoin. Die Genauigkeit der Einzelbestimmung ist nicht größer als 10—15%. Sie läßt sich durch mehrfache Bestimmung von Proben verschiedener Größe jedoch auf 5 bis 10% erhöhen.

II. Versuchsteil.

1. Vergleich der Harnsäure mit anderen Stickstoffquellen.

Die einleitend bereits erwähnten Kulturversuche wurden mit dem Grundmedium der CZAPEK-DOX-Lösung durchgeführt, wobei deren NaNO₃-Gehalt (0,2%) durch „stickstoff-äquivalente“ Mengen anderer N-Quellen — im Fall der Harnsäure 0,1% — ersetzt wurde. Das Wachstum der Kulturen des gleichen Pilzes auf den verschiedenen Nährlösungen — jeweils 50 cm³ in 250 cm³-ERLENMEYER-Kolben — wurde bei 28° C am 3. und am 5. Tage verglichen (Tab. 1).

2. Nachweis einer Uricase in Mycelextrakten.

a) Einfluß der N-Quelle des Mediums auf die Enzymaktivität.

Schon die ersten Versuche mit Wasser- oder Phosphatextrakten aus „Harnsäure-Mycel“ verschiedener Pilze ergaben die Anwesenheit eines harnsäureoxydierenden Enzyms.

Wir extrahierten anfangs den mit Seesand verriebenen Mycelbrei mit m/15- Na_2HPO_4 -Lösung. Da wir aber etwas später in Wasserextrakten praktisch die

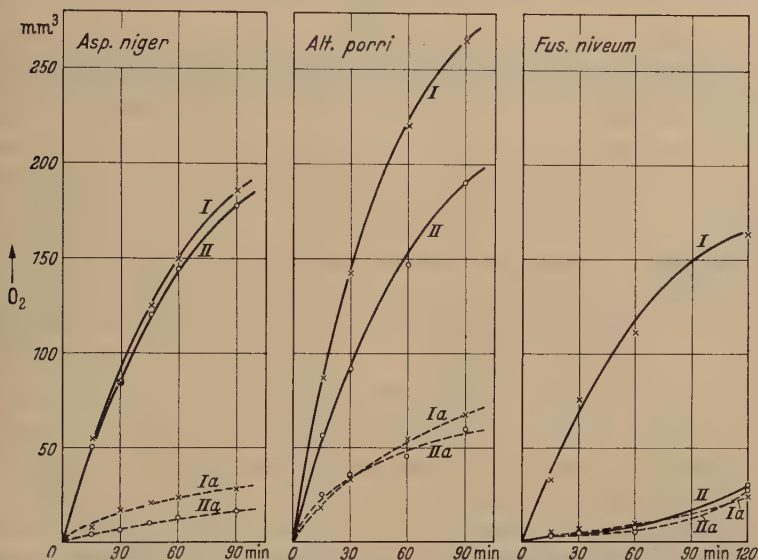


Abb. 1. Uricase-Aktivität von auf CZAPEK-Dox-Urat (I) und CZAPEK-Dox-Nitrat (II) gezeuhten Mycelien. O₂-Aufnahmen (in mm³) mit 2 cm³ Rohextrakt in Normalansätzen (S. 258). Ia und IIa Enzymeigenatmung. Enzymtrockengewicht (in mg): *Asp. niger* I 16,0, II 17,6; *Alt. porri* I 21,2, II 17,6; *Fus. nivium* I 38,4, II 39,2. 1 At. O/Mol. Harnsäure entspricht 224 mm³.

gleiche Aktivität fanden, zogen wir die letzteren weiterhin vor, vor allem in Hinblick auf die Vorteile bei der Dialyse und Trockengewichtsbestimmung.

Wirksame Extrakte wurden aber — mit einer Ausnahme — auch aus Mycel erhalten, das auf gewöhnlicher CZAPEK-Dox-Lösung mit Natriumnitrat als N-Quelle gezeuhtet worden war. Abb. 1 zeigt die O₂-Aufnahme durch Rohextrakte in drei typischen Fällen: bei *Asp. niger* haben Harnsäure- und Nitrat-Mycel nahezu die gleiche enzymatische Wirksamkeit, bei *Alt. porri* ist Harnsäure-Mycel dem Nitrat-Mycel überlegen²², und bei *Fus. nivium* zeigt allein das Harnsäure-Mycel beträchtliche Uricase-Aktivität.

Interessant war das Verhalten der *Fusarien*. Während das auf Harnsäure überhaupt nicht wachsende *Fus. equiseti* auch auf dem Wachstum

²² Die Überlegenheit des Harnsäure-Myfels erweist sich bei Berücksichtigung der Enzymtrockengewichte noch größer als sie in Abb. 1 erscheint (vgl. Tab. 3).

ermöglichenden Nitrat keine Uricase bildete, war diese bei *Fus. nivolum*, wie erwähnt, nur im Harnsäure-, nicht im Nitrat-Mycel nachweisbar und trat schließlich bei *Fus. sambucinum* sowohl auf Harnsäure wie auf Nitrat auf, wenn auch im ersteren Fall reichlicher als im letzteren. Uricase erscheint hier also innerhalb derselben Gattung im Sinne KARSTRÖMS²³ bald als konstitutives, bald als adaptives Ferment, soweit sie nicht überhaupt fehlt. In Tab. 2 ist dies durch die Angabe der O₂-Aufnahmen mit und ohne Harnsäure als Substrat belegt.

Tabelle 2. Uricase-Aktivität im Mycel von Fusarien in Abhängigkeit von der N-Quelle. mm³ O₂:Zeit in min. Normalansätze mit 2 cm³ Rohextrakt.

Organismus Extrakt aus Trockengew. in mg Substrat	<i>Fus. equiseti</i>		<i>Fus. nivolum</i>				<i>Fus. sambucinum</i>			
	Nitrat-Mycel		Harnsäure-Mycel		Nitrat-Mycel		Harnsäure-Mycel		Nitrat-Mycel	
	29,6		21,2		16,0		38,4		39,2	
	ohne	mit	ohne	mit	ohne	mit	ohne	mit	ohne	mit
15'	28	25	5	34	4	5	26	70	10	37
30'	37	38	7	76	4	5	53	126	25	69
60'	48	54	10	110	8	8	75	225	42	103
120'	64	70	25	164	28	30	121	345	65	202
180'	—	—	46	176	45	52	—	—	—	—

Uneinheitlich waren auch die Ergebnisse bei *Alternarien*, insofern, als sich in einigen Fällen — *Alt. tenuis* VII, *Alt. solani* VI/1 — Uricase als strikt konstitutives Ferment erwies, während in anderen Fällen — *Alt. tenuis* VI/4, *Alt. tenuissima* 1, *Alt. porri* — zur konstitutiven eine adaptive Komponente hinzukam. Ein anderer *Alt. tenuissima*-Stamm (2) ging — in Umkehrung der Verhältnisse bei *Fus. equiseti* — nicht auf Nitrat, wohl aber auf Urat an und lieferte dabei ein besonders enzymreiches Mycel. Anders als bei den Fungi imperfecti war bei allen untersuchten *Aspergillaceen* Uricase streng konstitutiv.

Tab. 3 bringt für alle in dieser Richtung geprüften Organismen eine Zusammenstellung der Q_{O₂}- und der (Q_{O₂}—q_{O₂})-Werte von Rohextrakten²⁴.

²³ Näheres über konstitutive und adaptive Enzyme in Mikroorganismen bei H. KARSTRÖM, Erg. Enzymforsch. 7, 350 (1938) und K. LINDERSTRÖM-LANG in NORD-WEIDENHAGEN, Handb. d. Enzymol. II, 1121. Leipzig 1940.

²⁴ Es erhebt sich hier wie noch des öfteren im folgenden die Frage, welcher Wert als tatsächliches Maß für die Intensität des Harnsäureabbaus angesehen werden kann. Es sei hier vorausgreifend das Ergebnis späterer Versuche an Rohextrakten aus *Asp. fumigatus* mitgeteilt, in denen neben der O₂-Aufnahme auch der Harnsäureschwund (photometrisch) verfolgt wurde (W. FRANKE u. L. KRIEG, Chem. Ber. 85, im Druck). Bei einer Enzymlösung, deren Eigenatmung 28% der Gesamtatmung ausmachte, stimmten die (prozentischen) Harnsäureabnahmen weit besser mit den um die Eigenatmung korrigierten als mit den Brutto-O₂-Aufnahmen überein, d. h.

Am Beispiel von *Alt. tenuis* VII haben wir auch den Einfluß weiterer N-Quellen (mit CZAPEK-DOX-Grundmedium) auf die Uricase-Aktivität der Mycelextrakte untersucht und folgende Reihe abnehmender Wirksamkeit gefunden: Harnsäure \geq NaNO_3 $>$ Glutaminsäure \geq Pepton $>$ Harnstoff $>$ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Mit Ammonsulfat als N-Quelle wird nur noch etwa die Hälfte der mit Harnsäure erhaltenen enzymatischen Aktivität im Mycel gefunden.

Tabelle 3.

Uricase-Aktivität von Harnsäure- und Nitrat-Mycelextrakten verschiedener Pilze.

Organismus	Harnsäure-Mycel		Nitrat-Mycel	
	Q_{O_2}	$Q_{O_2} - Q_{O_2}$	Q_{O_2}	$Q_{O_2} - Q_{O_2}$
<i>Asp. fumigatus</i> 26 . .	7,8	5,4	6,2	5,0
<i>Asp. niger</i> 23	13,8	12,0	11,4	10,5
<i>Pen. glaucum</i> 10 . .	20,8	16,2	17,2	15,1
<i>Pen. glabrum</i>	16,9	12,9	14,0	12,2
<i>Alt. tenuis</i> VII . . .	17,1	14,0	15,8	15,8
<i>Alt. solani</i> VI/1 . . .	10,3	7,5	8,6	7,1
<i>Alt. tenuis</i> VI/4 . . .	14,9	9,6	11,7	6,4
<i>Alt. tenuissima</i> 1 . .	8,7	5,4	3,5	3,0
<i>Alt. tenuissima</i> 2 . .	22,7	19,5	—	—
<i>Alt. porri</i>	16,4	11,7	7,9	5,6
<i>Fus. sambucinum</i> . .	7,3	4,6	3,7	2,8
<i>Fus. nivium</i>	6,4	5,5	1,2	0,2

b) Der Endpunkt der O_2 -Aufnahme.

In mehrstündigen WARBURG-Versuchen mit Normalansätzen wurde untersucht, ob ein Endpunkt des O_2 -Verbrauchs festzustellen war. Mit Rohextrakten aus *Asp. niger*, *Asp. fumigatus*, *Asp. oryzae*, *Pen. glabrum*, *Pen. chrysogenum*, *Alt. tenuis* (VI/4), *Alt. tenuissima*, *Alt. solani*, *Alt. porri* und *Fus. sambucinum* ging die O_2 -Aufnahme zu Ende, wenn sie 1 Atom O je Harnsäuremolekül — im Normalansatz 224 mm³ — betrug. Nur in einem einzigen Falle, nämlich bei Extrakten aus dem in Kairo von ägyptischen Tomaten isolierten *Alt. tenuis*-Stamm (VII), wurde fast die doppelte O_2 -Menge, also 2 Atome O je Harnsäuremolekül aufgenommen. Abb. 2 zeigt charakteristische Reaktionskurven für beide Fälle.

die Leeratmung darf zur Ermittlung des Harnsäureschwundes abgezogen werden. Dagegen näherten sich in einem Versuch mit einem Rohextrakt (aus nichtverarmtem Mycel), dessen Eigenatmung rund 50% des Gesamt- O_2 -Verbrauchs ausmachte, die Harnsäureabnahmen stark den aus dem unkorrigierten O_2 -Verbrauch berechneten. Hier drängt also die Substratatmung die Eigenatmung zurück.

In Tab. 3 ist offenbar in der überwiegenden Mehrzahl der Beispiele der 1. Fall realisiert.

Daß der Reaktionsstillstand nach Aufnahme von 1 Atom O je Harnsäuremolekül tatsächlich auf eine Erschöpfung des Substrats und nicht des Ferments zurückgeht²⁵, zeigt der Abb. 3 zugrundeliegende Versuch

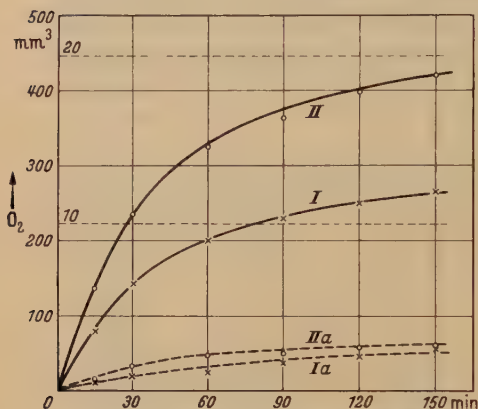


Abb. 2. O₂-Aufnahmen durch Rohextrakte von *Alt. tenuis* VI/4 (I) und *Alt. tenuis* VII (II) in Gegenwart von Harnsäure. O₂-Aufnahmen (in mm³) mit 2 cm³ Rohextrakt in Normalansätzen. Ia und IIa Enzymeligenatmung. Enzymtrockengewicht in I 38,2 mg; in II 43,8 mg. Punktierte Linien entsprechen 1 bzw. 2 O-Äquivalenten der eingesetzten Harnsäure.

mit *Asp. fumigatus*-Ferment, in dem zu Parallelansätzen nach dem Abklingen der Reaktion aus seitlichen Schliffansätzen der WARBURG-Gefäße einmal die ursprüngliche Ferment-, das andere Mal die ursprüngliche Substratmenge nochmals zugekippt und die weitere O₂-Aufnahme verfolgt wurde. Nur im Ansatz mit erneuter Substratzugabe erfolgt wieder lebhafter O₂-Verbrauch, der schließlich insgesamt das Doppelte des ersten Endwerts erreichte.

Es scheint also, daß in Schimmelpilzen zwei verschiedene uricolytische Fermenttypen von allerdings sehr unterschiedlicher Verbreitung vor-

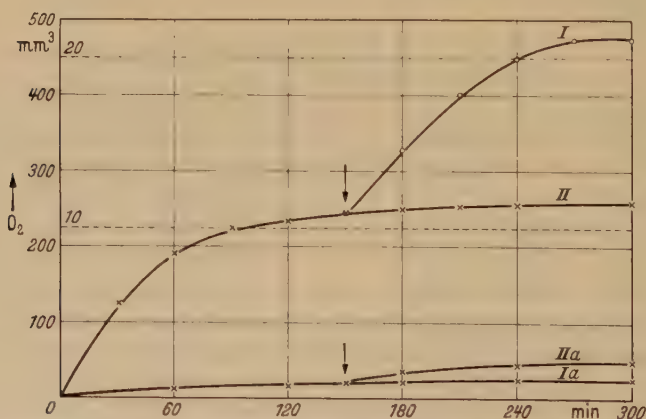


Abb. 3. O₂-Aufnahmen durch Rohextrakt aus *Asp. fumigatus* bei späterer nochmaliger Zugabe (↓) von Harnsäure (I) oder Enzym (II). Ursprünglich Normalansätze; Ia und IIa substratfreie Ansätze ohne bzw. mit nochmaliger Enzymzugabe (↓). Enzymtrockengewicht (einfach) 45,0 mg.

²⁵ Vgl. die Realisierung des anderen Falls (Enzymzerstörung) bei der *Soja-Lipoxydase*; W. FRANKE, J. MÖNCH, D. KIBAT u. A. HAMM: Liebigs Ann. **559**, 221 (1948).

kommen, die einstweilen (nach der Zahl der aufgenommenen Sauerstoffatome) als „Uricase I“ und „Uricase II“ unterschieden werden sollen, wobei durchaus offen bleiben soll, ob nicht Uricase II komplexer Natur ist.

c) Verbreitung des Enzyms.

Obwohl eine systematische Untersuchung der Verbreitung von Uricase in Schimmelpilzen nicht im Rahmen dieser Untersuchung lag, haben wir doch zur Gewinnung eines Überblicks an Rohextrakten die Fermentaktivität einer ganzen Anzahl von Arten und Stämmen der gleichen Art mit der WARBURG-Methodik nachgeprüft. Es wurden im allgemeinen 2 (Aspergillen) bis 3 Tage (übrige Arten bis auf *Cladosporium* mit 5 Tagen) alte, auf CZAPEK-DOX-Nitrat gewachsene Mycelien als Ausgangsmaterial verwendet. Es ist klar, daß bei Verwendung dieses Nährbodens nur die Organismen als fermentpositiv erfaßt werden, die Uricase als konstitutives Ferment enthalten²⁶. In Tab. 4 sind die in Normalansätzen erhaltenen Q_{O_2} - und ($Q_{O_2} - q_{O_2}$)-Werte zusammengestellt.

Unabhängig von der nach Tab. 3 in vielen Fällen auf harnsäurehaltigem Nährboden zu erwartenden höheren Enzymaktivität stellen die Aktivitätsangaben der Tab. 4 noch in doppelter Hinsicht Minimalwerte dar. Einmal wurde der Einfachheit halber in diesen Serienversuchen sowohl bei der Aktivitäts- wie bei der Trockengewichtsbestimmung auf Dialyse verzichtet; nach zahlreichen Stichproben würden aber dialysierte Extrakte 2—3mal höhere Aktivitätswerte liefern, bei zugleich — infolge weitgehenden Wegfalls von Donatoren — verhältnismäßig geringer gewordenen Eigenatmungen (vgl. S. 262). Dann aber wurde in diesen Reihenversuchen durchweg mit 2 cm³ Enzymlösung je Ansatz gearbeitet. Nach späteren Befunden (S. 275) dürfte aber bei dieser relativ hohen Enzymkonzentration in vielen Fällen keine Proportionalität mehr zwischen Enzymkonzentration und Umsatzgeschwindigkeit bestehen.

Auch bei Berücksichtigung des nur halbquantitativen Charakters der Aktivitätsangaben von Tab. 4 läßt sich sagen, daß Uricase ein in Schimmelpilzen sehr verbreitetes, wenn auch nicht ausnahmslos vorkommendes Ferment ist. Zu den Ausnahmen gehören einige *Alt. tenuis*-Stämme und offenbar die meisten *Fusarium*-Arten, wobei in diesen Fällen noch die — für *Fus. niveum* ja bewiesene (vgl. Tab. 2) — Möglichkeit der adaptiven Fermentbildung in Betracht kommt. (Unter natürlichen Lebensbedingungen dürften Schimmelpilze wohl in der Regel mit Nucleinsäure-Abbauprodukten in Berührung kommen.) In quantitativer Hinsicht liegen im einzelnen sehr erhebliche Unterschiede vor, und zwar nicht nur zwischen den einzelnen Gattungen und Arten, sondern auch zwischen verschiedenen Stämmen derselben Art, wie besonders an *Alt. tenuis* deutlich wird. Geringer ist die Variationsbreite bei *Asp. niger* und *Alt. solani*.

Bei einigen Stämmen wurde während der ganzen Dauer der Untersuchung (etwa 1¹/₄ Jahre) die enzymatische Aktivität gelegentlich nachgeprüft. Dabei zeigte sich bei *Alt. tenuis* VII, nicht dagegen bei *Aspergillaceen* (*Asp. fumigatus*, *Asp. niger*, *Pen. glaucum*, *Pen. glabrum*, *Pen.*

²⁶ Selbstverständlich fehlen auch die früher (S. 257) erwähnten Organismen, die auf CZAPEK-DOX-Lösung (z. B. wegen Wuchsstoffmangels) nicht oder nur spurenweise angingen.

Tabelle 4. *Uricase-Aktivität von Mycelextrakten verschiedener Schimmelpilze.*
Normalansätze mit jeweils 2 cm³ Rohextrakt.

Organismus	Enzymtrocken- gewicht (mg)	Q ₀₂	Q ₀₂ - q ₀₂
a) <i>Phycomyceten</i>			
<i>Rhizopus nigricans</i>	38,4	6,7	3,1
<i>Mucor plumbeus</i>	45,2	4,4	3,5
<i>Cunninghamella elegans</i>	14,6	9,3	3,3
b) <i>Ascomyceten</i>			
<i>Asp. niger</i> 7	28,6	6,3	6,1
<i>Asp. niger</i> 10	16,4	8,4	7,4
<i>Asp. niger</i> 13	23,2	14,1	12,6
<i>Asp. niger</i> 15	28,0	8,9	7,6
<i>Asp. niger</i> 23	16,8	11,2	10,2
<i>Asp. niger</i> 24	24,8	6,2	4,9
<i>Asp. glaucus</i>	38,4	4,1	3,3
<i>Asp. fumigatus</i> 26	37,6	6,9	6,6
<i>Asp. fumigatus</i> 27	37,0	5,5	4,6
<i>Asp. oryzae</i>	31,2	4,5	4,0
<i>Pen. glaucum</i> 1	42,2	4,3	4,3
<i>Pen. glaucum</i> 10	14,0	17,1	15,2
<i>Pen. glabrum</i>	26,2	12,6	11,6
<i>Pen. notatum</i> 34	30,8	5,5	3,5
<i>Pen. notatum</i> 192	32,2	4,0	2,1
<i>Pen. chrysogenum</i>	43,6	4,2	3,8
<i>Neurospora sitophila</i>	36,6	6,9	4,6
<i>Gliocladium</i> sp.	40,6	2,5	1,0
c) <i>Fungi imperfecti</i>			
<i>Alt. tenuis</i> 0	38,8	5,4	3,8
<i>Alt. tenuis</i> I	32,0	1,6	0
<i>Alt. tenuis</i> III/1	42,4	4,9	3,8
<i>Alt. tenuis</i> III/2	26,6	1,7	0
<i>Alt. tenuis</i> VI/1	17,6	9,8	5,9
<i>Alt. tenuis</i> VI/2	14,8	11,2	5,7
<i>Alt. tenuis</i> VI/3	21,6	7,6	4,1
<i>Alt. tenuis</i> VI/4	17,4	11,7	6,4
<i>Alt. tenuis</i> VII	53,0	13,0	11,1
<i>Alt. tenuis</i> IX/1	45,2	6,7	5,4
<i>Alt. tenuis</i> IX/2	36,0	3,5	1,6
<i>Alt. tenuis</i> IX/3	22,6	8,1	3,7
<i>Alt. tenuissima</i> 1	22,6	3,8	3,8
<i>Alt. solani</i> 0	26,2	7,2	3,7
<i>Alt. solani</i> V	22,2	16,0	7,7
<i>Alt. solani</i> VI/1	34,0	10,4	7,9
<i>Alt. solani</i> VI/2	22,0	8,4	6,4
<i>Alt. gossypina</i>	20,4	5,9	3,7
<i>Alt. porri</i>	21,2	8,0	5,6
<i>Stemphylium</i> sp.	25,6	3,9	2,2

Tabelle 4. (Fortsetzung).

Organismus	Enzymtrocken- gewicht (mg)	Q ₀₂	Q ₀₂ -q ₀₂
<i>Fus. sambucinum</i>	28,4	4,5	4,1
<i>Fus. semitectum</i>	26,6	4,2	0,4
<i>Fus. equiseti</i>	29,6	3,8	0,2
<i>Fus. niveum</i>	16,0	1,2	0,2
<i>Botrytis cinerea</i>	30,4	4,5	1,9
<i>Cladosporium</i> sp.	30,2	5,0	2,2
<i>Trichoderma koningi</i>	20,8	4,4	2,0

chrysogenum) ausgesprochene Degeneration mit stark abnehmender Enzym-Aktivität, die zuletzt nur noch die Hälfte bis ein Drittel der ursprünglich vorhandenen ausmachte. Gleichzeitig sanken in diesem Zeitraum auch die Trockengewichte der Mycelextrakte auf etwa die Hälfte, d. h. es ging nicht nur weniger aktives, sondern überhaupt weniger Enzym in Lösung. Rein äußerlich war die Degeneration bei *Alternaria* an beschleunigter Konidienbildung und fühlbarer „Verhärtung“ der Myceldecken (bei gegen früher ungefähr erhalten gebliebener Mycelausbeute) erkennbar. Ob die Degeneration von *Alternaria* mit der Wahl des Nährbodens für die Stammkultur (CZAPEK-DOX-Agar gegenüber Würzeagar bei *Aspergillus* und *Penicillium*) zusammenhängt, kann einstweilen nicht entschieden werden²⁷. Tab. 5 enthält Aktivitätsangaben für

 Tabelle 5. Zeitliche Verfolgung der Aktivität von Mycelextrakten.
Versuchsbedingungen wie in Tab. 4.

Zeit	<i>Alt. tenuis</i> VII		<i>Asp. fumigatus</i> 26		<i>Asp. niger</i> 24	
	Q ₀₂	Q ₀₂ -q ₀₂	Q ₀₂	Q ₀₂ -q ₀₂	Q ₀₂	Q ₀₂ -q ₀₂
Okt. 50 . . .	17,2	13,8				
Dez. 50 . . .	13,2	11,4	6,4	5,5		
Jan. 51 . . .	8,7	8,1	4,8	4,2	3,1	2,4
Febr. 51 . . .			6,9	6,6	3,5	3,2
März 51 . . .	9,4	7,9	5,5	4,6		
April 51 . . .	8,1	6,2	4,8	3,7	3,0	2,3
Mai 51 . . .					3,4	2,6
Juni 51 . . .	7,7	6,4	4,8	4,2		
Aug. 51 . . .			5,0	4,1		
Okt. 51 . . .	8,4	4,1			5,3	4,8
Nov. 51 . . .			5,1	4,3		
Dez. 51 . . .	5,9	4,2				
Febr. 52 . . .			6,2	5,1		
März 52 ²⁸ . .	6,1	4,2	7,9	7,4		

²⁷ Vor Beginn dieser Untersuchung war der *Alt. tenuis*-Stamm VII bereits mehrere Jahre von Dr. E. M. TAHA in Kairo auf CZAPEK-DOX-Agar weitergezüchtet worden; vgl. E. M. TAHA, Dissertation Fuad I-Universität Kairo 1949.

²⁸ Züchtung auf CZAPEK-DOX-Urat.

die drei am regelmäßigsten untersuchten Stämme *Alt. tenuis* VII, *Asp. fumigatus* 26 und *Asp. niger* 24, gewachsen auf CZAPEK-DOX-Nitrat-Lösung.

In Wirklichkeit ist der Aktivitätsabfall bei *Alt. tenuis* VII noch stärker als er in den ja aus den Anfangsgeschwindigkeiten der O₂-Aufnahmen berechneten Atmungsgrößen zum Ausdruck kommt. Mit Extrakten aus „geschwächtem“ Mycel wird nämlich nicht mehr annähernd der theoretische Endwert der O₂-Aufnahme erreicht, sondern die Enzymwirkung kommt bei einem Bruchteil dieses O₂-Verbrauchs zum Erliegen. Offenbar ist das Enzym in solchen Extrakten nicht nur schwächer, sondern auch labiler als in „Normalextrakten“, eine Erscheinung, die wir übrigens häufig auch bei „schwachen“ Enzymlösungen anderer Herkunft beobachtet haben (vgl. auch S. 274/5). Tab. 6 gibt zur Illustrierung typische Reaktionskurven zweier Rohextrakte aus *Alt. tenuis* VII vom Anfang und vom Ende dieser Untersuchung.

Tabelle 6. Reaktionskurven zweier *Alt. tenuis*-Extrakte von Nov. 50 und März 52. mm³ O₂; Zeit in min. Normalansätze mit 2 cm³ Rohextrakt.

Zeit des Versuchs Trockengewicht (mg) Substrat	Nov. 50 42,2		März 1952 23,4	
	ohne	mit	ohne	mit
15'	16	137	13	30
30'	35	236	19	51
60'	46	322	22	66
90'	51	362	25	76
120'	59	401	29	84

Wir haben wiederholt versucht, den *Alt. tenuis*-Stamm VII, an dem uns als einzigem Produzenten des Uricasetyps II (S. 263) viel lag, durch Variation des Nährmediums wieder zu regenerieren. Mit CZAPEK-DOX-Urat gelang dies nur ganz vorübergehend. Mit CZAPEK-DOX-Lösung und Hefewasser im Verhältnis 1:1 wurden im August 51 nochmals gute Enzymaktivitäten (z. B. Q₀₂ 12,9, Q₀₂-Q₀₂ 11,5) erhalten, aber auch diese Erholung währte nur wenige Wochen. Von da ab war der Aktivitätsabfall nicht mehr aufzuhalten. Auch Züchtung auf Bierwürze oder Hefewasser-Glucose sowie eine Tomatenpassage des Stamms waren ohne nennenswerten Erfolg²⁹.

d) Einfluß des Mycelalters auf die Enzymaktivität.

Von *Asp. fumigatus* 26 wurden 2—8, von *Alt. tenuis* VII 3—10 Tage auf nitrathaltiger CZAPEK-DOX-Lösung gezüchtete Mycelien in üblicher Weise auf Fermentlösung aufgearbeitet. Abb. 4 zeigt an Hand der Atmungsgrößen den mit zunehmendem Mycelalter kontinuierlich erfolgenden Aktivitätsabfall, woraus die Notwendigkeit der Verwendung möglichst jungen Mycels für die Gewinnung aktiver Fermentlösungen folgt. Auch bei anderen Oxydationsfermenten aus Schimmelpilzen (z. B.

²⁹ Ähnliche Inaktivierungserscheinungen waren früher bei der *Glucose-oxydase* aus Aspergillaceen beobachtet worden, dort von abnehmender Fähigkeit zur Konidienbildung begleitet; vgl. W. FRANKE u. M. DEFFNER: Liebig's Ann. **541**, 117 (1939).

Triosephosphat-dehydrase³⁰ und l- und d-Aminosäure-oxydase aus *Aspergillaceen*³¹) sind ähnliche Erfahrungen gemacht worden³².

Bei *Pen. glaucum* 1 wurde ein orientierender Versuch mit 1-, 2- und 3tägigem Mycel gemacht, wobei im 1. Fall noch keine zusammenhängenden Decken, sondern nur Flocken und „Inseln“ vorlagen. Nach Tab. 7 zeigen die Mycelextrakte in diesem

Tabelle 7. Uricase-Aktivität von Extrakten aus sehr jungem Mycel von *Pen. glaucum*.

Mycelalter (in Tagen)	1	2	3
Enzymtrockengewicht (in Milligramm)	20,8	20,2	23,1
Q ₀₂	4,3	3,6	3,3
Q ₀₂ —Q ₀₂	2,7	2,7	3,0

Zeitbereich annähernd gleiche Aktivität. Da in der gleichen Zeit aber die Mycelgewichte und entsprechend die Enzymausbeuten ums Mehrfache zunehmen, hat die Verwendung sehr jungen Mycels für die Enzymgewinnung keinerlei Vorteil.

e) Verwendung von Schüttelmycel.

In einigen orientierenden Versuchen wurde „Schüttelmycel“ nach KLUYVER u. PERQUIN³³, das heute besonders bei der technischen Durchführung mikrobiologischer Oxydationsprozesse eine so große Rolle spielt³⁴, als Ausgangsmaterial verwendet. Hiermit wurden aus *Asp. fumigatus* 26 Extrakte mit etwas höherer, aus *Pen. glaucum* 10 solche mit erheblich geringerer Anfangsaktivität, verglichen mit Oberflächenmycel-Extrakten ähnlichen Trockengewichts, erhalten. Da die Aktivität der letzteren im Laufe der Reaktion viel weniger nachläßt als die der ersteren und zudem die Mycelausbeute beim Submersverfahren nur etwa $\frac{1}{5}$ von der des Oberflächenverfahrens beträgt, wurde auf weitere Versuche in dieser Richtung verzichtet³⁵.

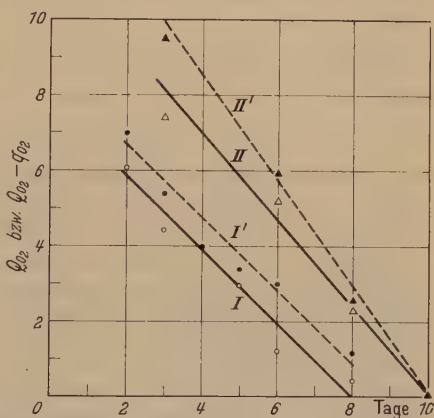


Abb. 4. Abhängigkeit der Uricase-Aktivität vom Mycelalter. Normalansätze mit Rohextrakten (2 cm³), Trockengewicht bei *Asp. fumigatus* 30,0–46,2 mg, bei *All. tenuis* 37,4 bis 43,6 mg. Ausgezogene Linien und o bzw. Δ : Q₀₂—Q₀₂. Getrichelte Linien und • bzw. \blacktriangle : Q₀₂. I, I' *Asp. fumigatus*; II, II' *All. tenuis*.

³⁰ F. LYNEN u. H. P. HOFFMANN-WALBECK: Liebigs Ann. **559**, 153 (1948).

³¹ a) S. G. KNIGHT: J. Bacter. **55**, 401 (1948); b) R. L. EMERSON, M. PUZISS u. S. G. KNIGHT: Arch. Biochem. **25**, 299 (1950).

³² Etwas abweichende Verhältnisse waren bei der Glucose-oxydase aus *Asp. niger* gefunden worden, wo die Mycelaktivität vom 2. zum 4. Tage auf ein gutes Drittel abfiel, um sich dann wenigstens 1 Woche auf dieser Höhe zu halten (vgl. ²⁹).

³³ A. J. KLUYVER u. L. H. C. PERQUIN: Biochem. Z. **266**, 68 (1933).

³⁴ Vgl. z. B. K. BERNHAUER: Erg. Enzymforsch. **11**, 151 (1950).

³⁵ Neuerdings hat K. BURTON [Biochemic. J. **50**, 258 (1951)] auch bei der l-Aminosäure-oxydase aus *Neurospora crassa* die Unterlegenheit von Schüttel- gegenüber Oberflächen-Mycel als Enzymquelle festgestellt.

Die Züchtung der Pilze erfolgte in 2 l-KLUYVER-Kolben (SCHOTT-Jena) unter 2tägigem Durchsaugen steriler Luft, wobei die Innentemperatur durch Strahlungswärme auf etwa 28° gehalten wurde. Das flockige, nur auf der Siebplatte etwas kompaktere Material wurde in Leitungswasser in gleicher Weise 12 Std verarmt, wiederholt gewaschen, abgepreßt und wie üblich auf Extrakt verarbeitet. Tab. 8 enthält das Ergebnis von Parallelversuchen mit Schüttel- und Oberflächenmycel. Die Indices der Atmungsgrößen, die in Normalansätzen mit 2 cm² Mycelextrakt bestimmt wurden, beziehen sich auf die Versuchszeiten 15 und 60 min. Die Differenz zwischen dem 15 und dem 60 min-Wert ist ein Maß für die Inaktivierung des Ferments während des Versuchs.

Tabelle 8. Vergleich der Uricase-Aktivität von Schüttel- und von Oberflächenmycel.

Organismus	<i>Asp. fumigatus</i>		<i>Pen. glaucum</i>	
	Schüttelmycel	Oberflächenmycel	Schüttelmycel	Oberflächenmycel
Enzymtr.-Gew. (mg) .	29,4	27,0	13,6	14,0
$Q_{O_2}^{15}$	8,2	6,2	11,2	17,1
$Q_{O_2}^{60}$	4,9	5,6	5,6	11,0
$(Q_{O_2}-Q_{O_2})^{15}$	6,4	5,1	8,8	15,2
$(Q_{O_2}-Q_{O_2})^{60}$	3,8	4,5	4,0	9,2

f) Uricase-Aktivität von Mycelpulvern.

Im Hinblick auf die einleitend erwähnten negativen Befunde von BRUNEL haben wir auch die Aktivität von Mycelpulvern und Mycelpulverextrakten untersucht, und zwar bei *Asp. niger*, *Asp. fumigatus* und *Alt. tenuis*.

Entsprechend den Angaben von BRUNEL haben wir gewaschenes, abgepreßtes, im CaCl₂-Exsiccator getrocknetes und anschließend in der Kugelmühle gemahlenes Mycel in der diesmal auf p_H 7,3 gepufferten Reaktionslösung suspendiert, darüber hinaus aber auch Parallelversuche mit zentrifugierten Trockenmycel-Extrakten angestellt. Abweichend von BRUNEL haben wir mit manometrischer Methodik und bei 30° (statt 38°) gearbeitet. Obwohl auch schon mit den von BRUNEL verwendeten Mycelpulver-Suspensionen (1%) eindeutige Harnsäureoxydation nachweisbar ist, geben wir der Deutlichkeit halber im folgenden eine Versuchsreihe mit 5fach höherer Mycelmenge wieder.

In der letzten Reihe der Tab. 9 ist für die Zentrifugate der bei Versuchsende durch Colorimetrie (S. 259) annähernd ermittelte Harnsäureschwund (in % der Ausgangsmenge) angegeben³⁶. Unter S (Suspension) und Z (Zentrifugat) sind die im Gesamtansatz enthaltenen Trockengewichte verzeichnet.

Die enzymatische Aktivität von Mycelpulver-Suspension und -Extrakt aus *Asp. niger* fällt im Gegensatz zu *Asp. fumigatus* und *Alt. tenuis* während des Versuchs stark ab. Bei *Asp. fumigatus* stört etwas die hohe Mycel- bzw. Extrakteigenatmung. Trotzdem steht in allen Fällen ein beträchtlicher Harnsäureabbau außer Zweifel. (Zum vergleichsweise geringeren Harnsäureschwund bei *Alternaria* vgl. S. 286). Das abweichende

³⁶ Die Mindest-O₂-Aufnahme für das Verschwinden der eingesetzten Harnsäure (1 Atom O/Harnsäuremolekül) liegt bei 224 mm³. (Vgl. aber S. 263 u. 286.)

Versuchsergebnis BRUNELS dürfte auf einen vielleicht in der Methodik begründeten Fehler zurückgehen.

Tabelle 9. *Uricase-Aktivität von Mycelpulver und Mycelpulverextrakt.*
Normalansätze.

Zeit (min)	mm ³ O ₂				% Harnsäure- schwund im Zentrifugat
	Suspension		Zentrifugat		
	ohne Substrat	mit Substrat	ohne Substrat	mit Substrat	
a) <i>Asp. niger</i> 24 (S 250 mg, Z 34 mg)					
15	14	51	4	42	55
30	21	61	4	51	
60	28	79	7	71	
90	35	93	15	88	
120	50	107	19	105	
150	53	116	19	114	
(q ₀₂ bzw. Q ₀₂)	0,22	0,82	0,47	4,9)	
b) <i>Asp. fumigatus</i> 26 (S 250 mg, Z 37 mg)					
15	42	72	8	47	95
30	78	134	21	80	
60	126	245	42	156	
90	161	318	64	215	
120	183	387	84	255	
150	210	440	93	270	
(q ₀₂ bzw. Q ₀₂)	0,67	1,2	0,87	5,1)	
c) <i>Alt. tenuis</i> VII (S 250 mg, Z 38 mg)					
15	21	90	14	63	65
30	33	125	18	77	
60	59	194	32	139	
90	67	256	40	182	
120	84	300	50	230	
150	92	337	61	262	
(q ₀₂ bzw. Q ₀₂)	0,34	1,4	1,5	6,6)	

3. Orientierende Reinigungsversuche.

Literaturangaben über die Reinigung desmolytischer Fermente aus Schimmelpilzen sind einstweilen noch sehr spärlich.

Im Reinzustande isoliert wurde nur die schon vorher als Flavinferment erkannte²⁹ Glucose-oxydase³⁷. In den anderen Fällen waren die Enzyme entweder unlöslich (z. B. l-Aminosäure-oxydase³¹, Succino-dehydrase³⁸) oder solabil (z. B. Aldolase³⁰, Triosephosphat-dehydrase³⁰, d-Aminosäure-oxydase^{31b}), daß eine Reinigung erst gar nicht versucht wurde³⁹.

³⁷ C. E. COULTHARD, R. MICHAELIS, W. F. SHORT, G. SYKES, G. E. H. SKRIMSHIRE, A. F. B. STANDEFAST, J. H. BIRKINSHAW u. H. RAISTRICK: Nature **150**, 634 (1942); Biochemic. J. **39**, 24 (1945).

³⁸ C. J. SHEPHERD: Biochemic. J. **48**, 483 (1951).

³⁹ Unlängst hat K. BURTON³⁵ die lösliche l-Aminosäure-oxydase aus *Neurospora* 4,5fach angereichert und ihre Flavinprotein-Natur wahrscheinlich gemacht.

Die Tatsache, daß unsere Uricase-Rohlösungen 1—2 Tage ohne größeren Enzymverlust im Eisschrank aufbewahrt wie auch die gleiche Zeit gegen fließendes Leitungswasser dialysiert werden konnten (woraus bereits folgte, daß die Pilzuricase keines dialysierbaren Coferments oder Aktivators zu ihrer Wirkung bedarf), ließ einige orientierende Reinigungsversuche angezeigt erscheinen.

a) Ammonsulfatfällung.

Nachstehend werden zwei Versuchsreihen mitgeteilt, in denen Rohextrakte sowohl aus *Asp. fumigatus* 26 wie aus *Alt. tenuis* VII der Ammonsulfatfällung bei den Sättigungsgraden 0,33, 0,5, 0,67 und 0,9 unterworfen wurden. Die erhaltenen Niederschläge wurden nach ein-tägiger Dialyse gegen fließendes Leitungswasser auf ihre Aktivität geprüft⁴⁰.

Die Fällungen wurden stets unter Eiskühlung vorgenommen. Während bei *Alternaria* sich zusammenballende, gut zentrifugierbare Niederschläge erhalten wurden, waren die aus *Aspergillus* erhaltenen Fällungen bei 5000 U/min nicht oder nur mangelhaft zentrifugierbar. Es wurde daher im Eisschrank durch Faltenfilter filtriert, was mehrere Stunden in Anspruch nahm. Bei der Dialyse der in dest. Wasser aufgenommenen Fällungen setzten sich Niederschläge — bei *Aspergillus* hell, bei *Alternaria* dunkel gefärbt — ab, die in beiden Fällen wegen ihrer schweren Zentrifugierbarkeit abfiltriert werden müssen. Ihre Aktivität ist — bei beträchtlicher Eigenatmung — so gering, daß sie vernachlässigt werden kann. Schließlich werden gelbstichige — bei *Aspergillus* wasserklare, bei *Alternaria* getrübte — Filtrate erhalten. Ihre Trockengewichte lagen zwischen 1,5 und 5,5 mg/cm³, während die Rohextrakte zwischen 15 und 25 mg/cm³ enthalten hatten.

In Tab. 10 sind neben den $Q_{0,2}$ -Werten der einzelnen Präparate die jeweils vorhandenen Enzymeinheiten ($EE = Q_{0,2} \cdot \text{mg}$ Gesamt-trockengewicht), die Aktivitätssteigerung $Q_{0,2}/Q_{0,2}^0$, bezogen auf den Ausgangsextrakt, und die prozentische Enzymausbeute ($EE/EE^0 \cdot 100$) bei der Ammonsulfatfällung angegeben; eingeklammerte Anreicherungsgrade beziehen sich auf die dialysierten Extrakte.

In einer zweiten, am gleichen *Alt. tenuis*-Stamm zu anderer Zeit ausgeführten Versuchsreihe wurden erhalten beim:

Ammonsulfat-Sättigungsgrad	0,33	0,67	0,9,
die Anreicherungsgrade	5,0 (2,1)	7,6 (2,8)	7,6 (3,2)
und die Enzymausbeuten	32%	77%	83%.

Durch Ammonsulfatfällung und Dialyse wurde also bei *Asp. fumigatus* maximal eine etwa 25fache, bei *Alt. tenuis* eine etwa 10fache Anreicherung gegenüber dem Rohextrakt erzielt. Dabei nimmt der Reinigungseffekt bei *Asp. fumigatus* mit steigender Ammonsulfat-Konzentration dauernd zu, während er bei *Alt. tenuis* bei Halbsättigung bereits seinen Maximalwert erreicht. Im ganzen ist das *Alternaria*-Ferment leichter und

⁴⁰ Zur Ermittlung des Proportionalitätsbereichs wurden gleichzeitig stets mehrere Enzymkonzentrationen eingesetzt (vgl. S. 258 u. 275).

mit besserer Ausbeute, aber geringerer Anreicherung fällbar als das *Aspergillus*-Ferment. In beiden Fällen erscheinen weitere Reinigungsversuche (z. B. mit fraktionierter Fällung) aussichtsreich.

Tabelle 10. Reinigung der Schimmelpilz-Uricasen durch Ammonsulfatfällung.

Reinigungsstufe	Q _{O₂}	EE	Q _{O₂} /Q _{O₂} ⁰	EE/EE ⁰ · 100
<i>a) Asp. fumigatus</i> 26.				
Rohextrakt I	7,0	38200		
(Rohextrakt I dialysiert)	(21)			
Ammonsulfatfällung (0,33)	33	1200	4,7 (1,6)	3
Rohextrakt II	6,7	6300		
(Rohextrakt II dialysiert)	(19)			
Ammonsulfatfällung (0,5)	85	2600	12,7 (4,5)	41
Rohextrakt III	5,2	9700		
(Rohextrakt III dialysiert)	(14)			
Ammonsulfatfällung (0,67)	107	6900	20,6 (7,7)	71
Rohextrakt III	5,2	6500		
(Rohextrakt III dialysiert)	(14)			
Ammonsulfatfällung (0,9)	129	5200	24,8 (9,2)	80
<i>b) Alt. tenuis</i> VII.				
Rohextrakt I	9,5	7200		
(Rohextrakt I dialysiert)	(25)			
Ammonsulfatfällung (0,33)	56	2500	5,9 (2,2)	35
Rohextrakt I	9,5	7200		
(Rohextrakt I dialysiert)	(25)			
Ammonsulfatfällung (0,5)	98	5300	10,3 (3,9)	74
Rohextrakt II	11	3700		
(Rohextrakt II dialysiert)	(29)			
Ammonsulfatfällung (0,67)	89	3100	8,1 (3,1)	84
Rohextrakt II	11	3700		
(Rohextrakt II dialysiert)	(29)			
Ammonsulfatfällung (0,9)	113	3800	10,3 (3,9)	100

b) Fällung mit organischen Lösungsmitteln

ergab auf einfache Weise zwar weniger hohe Anreicherung, dafür aber Trockenpräparate, die bei Aufbewahrung im Vakuumexsikkator wenigstens begrenzte Zeit verwendungsfähig blieben. So zeigte ein Acetonpräparat aus *Asp. fumigatus* nach 1 Woche noch 90%, nach 3 Wochen noch 70% der Ausgangsaktivität, während ein Alkohol-Äther-Präparat nach der gleichen Zeit nur mehr 50% Aktivität aufwies.

Wir wandten zwei Verfahren an, die sich bei der Glucose-oxydase aus Pilzen gut bewährt hatten⁴¹. Im einen Falle ließen wir Rohextrakt in das 10fache Volumen eines auf 0° abgekühlten *Alkohol-Äther*-Gemischs (2:1) eintropfen, im anderen Falle füllten wir gekühlten Rohextrakt mit dem doppelten Volumen gleichfalls gekühlten *Acetons*.

Die flockigen Fällungen wurden möglichst rasch abzentrifugiert, auf Tonteller gestrichen und in den Vakuumexsikkator gebracht. Zur Herstellung von Enzymlösungen wurden sie mit etwa der 50fachen Menge Wasser verrieben, wobei 25 bis 40% des Materials in Lösung gingen; vom Unlöslichen, das nur geringe Aktivität zeigte, wurde abzentrifugiert. Die Lösungen wurden zur Trockengewichtsbestimmung dialysiert.

Tab. 11 gibt in gleicher Darstellungsweise wie Tab. 10 die Ergebnisse einiger Reinigungsversuche an Rohextrakten von *Asp. fumigatus* 26 und *Alt. tenuis* VII wieder.

Tabelle 11.

Reinigung der Schimmelpilz-Uricasen durch Aceton- und Alkohol-Äther-Fällung.

Reinigungsstufe	Q ₀₂	EE	Q ₀₂ /Q ₀₂ ⁰	EE/EE° · 100
<i>a) Asp. fumigatus</i> 26.				
Rohextrakt	9,2	17 800		
(Rohextrakt dialysiert)	(24)			
Acetonfällung	58	10 600	6,3 (2,4)	60
Alkohol-Äther-Fällung	30	9 300	3,3 (1,3)	52
<i>b) Alt. tenuis</i> VII.				
Rohextrakt	10	3 900		
(Rohextrakt dialysiert)	(27)			
Acetonfällung	50	3 100	5,0 (1,9)	79

Bei weiteren Reinigungsversuchen wird man sich auf die Acetonfällung beschränken können, die reinere und beständigere Präparate liefert.

Auch die Darstellung aktiver Acetonpräparate gelingt einstweilen nicht mit der gleichen Sicherheit wie die aktiver Ammonsulfatfällungen. Bisweilen werden „labile“ Präparate erhalten, die bei guter Anfangsaktivität starken Wirkungsverlust während der Reaktion zeigen (vgl. S. 268). Bei der Lagerung verändern sich auch aktive Präparate in der gleichen Richtung.

4. Zur Kinetik der Uricasewirkung.

Die Untersuchungen dieses und der folgenden Abschnitte beschränken sich auf *Alt. tenuis*; es kamen die beiden Stämme VI/1 und VII als typisch für die Produktion von „Uricase I“ und „Uricase II“ zur Verwendung. Über das *Aspergillus*-Ferment, das in seinen Eigenschaften im wesentlichen mit der *Alternaria*-Uricase I übereinstimmt, wird gesondert berichtet werden⁴². Die Untersuchung der beiden *Alternaria*-Stämme erfolgte auch im Hinblick auf die Frage einer komplexen Natur der „Uricase II“, die allerdings nicht entschieden werden konnte.

⁴¹ Vgl. W. FRANKE in BAMANN-MYRBÄCK: Die Methoden der Fermentforsch. III 2385. Leipzig 1941.

⁴² W. FRANKE u. L. KRIEG: Chem.-Ber. 85, im Druck (1952).

a) Einfluß der Enzymkonzentration.

Abb. 5 bringt die O_2 -Aufnahmen in Normalansätzen mit variiert Enzymmenge zur Anschauung. Wie ersichtlich, besteht nur im Bereich niedriger Enzymkonzentration (zwischen I und II) annähernde Proportionalität zwischen Anfangsgeschwindigkeit und Enzymkonzentration, während bei Steigerung der letzteren die Reaktionsgeschwindigkeit relativ langsamer zunimmt. Diese Erscheinung, die bei rohen, wie bei gereinigten Enzymlösungen auftrat, mußte beim Vergleich von Enzymaktivitäten (z. B. bei Reinigungs- oder Hemmungsversuchen, S. 272 bzw. 278/9) durch vorherige Ermittlung des „Proportionalitätsbereichs“ stets berücksichtigt werden.

So berechnet sich beispielsweise aus dem Ansatz IV der Abb. 5 (mit 2 cm³ Enzym, wie sie in den Versuchen des 2. Abschnitts durchweg verwendet worden waren) ein Q_{O_2} -Wert von 8,7, während aus den Ansätzen des Proportionalitätsbereichs (I, II) ein Wert von etwa 20 resultiert (vgl. S. 265).

Bisweilen komplizieren sich die Verhältnisse noch dadurch, daß in stark verdünnter Lösung die Enzymwirkung rascher nachläßt als in konzentrierterer, wofür auch in Abb. 5 Andeutungen vorhanden sind. In Zweifelsfällen wurde der Aktivitätsberechnung die niedrigste Enzymkonzentration zugrunde gelegt, bei welcher (in mehrstündigen Versuchen) der theoretische Endwert der O_2 -Aufnahme noch annähernd erreicht wurde bzw. seine schließliche Erreichung wahrscheinlich war.

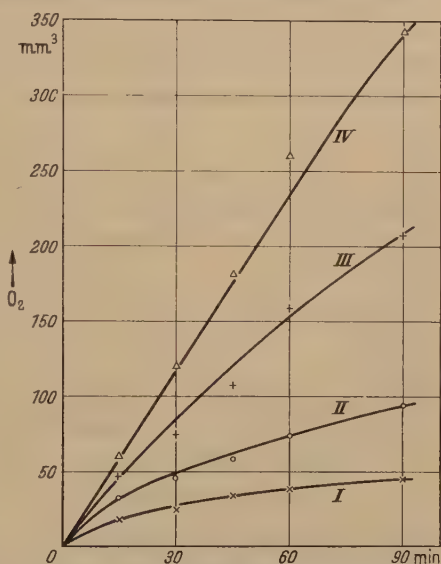


Abb. 5. Einfluß der Enzymkonzentration auf die Reaktionsgeschwindigkeit bei *Alt. tenuis* VII. Normalansätze mit Rohextrakt (14 mg/cm³): I 0,25, II 0,5, III 1,0, IV 2,0 cm³.

b) Einfluß der Substratkonzentration.

In Ansätzen mit Rohextrakten beider *Alternaria*-Stämme wurde die Substratkonzentration im Bereich zwischen m/500 und m/50 variiert. Mit beiden Enzymlösungen wurde übereinstimmend ein Konzentrationsoptimum bei m/100-Harnsäure festgestellt (Abb. 6). Für die in üblicher Weise⁴³ graphisch ermittelte Dissoziationskonstante des Enzym-Substrat-

⁴³ Vgl. z. B. J. B. S. HALDANE u. K. G. STERN: Allgemeine Chemie der Enzyme, S. 34. Dresden u. Leipzig 1932.

Komplexes (MICHAELIS-Konstante) ergibt sich ebenfalls übereinstimmend ein Wert von $3 \cdot 10^{-3} \text{m}$ ⁴⁴.

Bei der Standardkonzentration ($\text{m}/250$) der Normalansätze beträgt die Umsatzgeschwindigkeit rund $\frac{2}{3}$ der optimalen.

c) p_{H} -Einfluß.

Abb. 7 gibt *Aktivitäts- p_{H} -Kurven* für die Enzyme beider *Alternaria*-stämmen^{44a}. In beiden Fällen liegt das Wirkungsoptimum bei p_{H} 7, also um wenigstens 2 p_{H} -Einheiten tiefer als beim tierischen Ferment^{45, 46}.

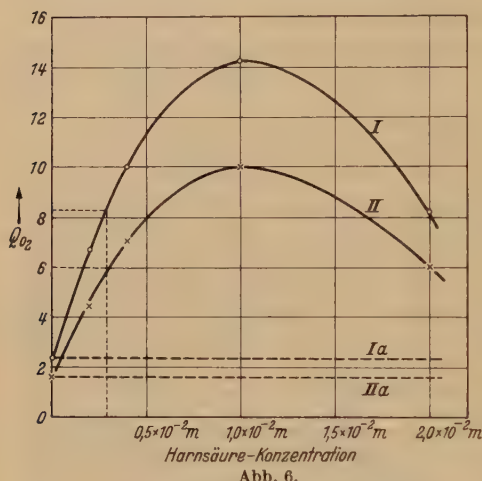


Abb. 6.

Abb. 6. Abhängigkeit der spezifischen Reaktionsgeschwindigkeit (Q_{O_2}) von der Harnsäure-Konzentration bei *Alt. tenuis* VII (I) und VI/1 (II). Normalansätze mit 2 cm^3 Rohextrakt. Ia, IIa Enzymeigenatmung (q_{O_2}). Punktuelle Linien: Ermittlung der MICHAELIS-Konstante aus $(Q_{\text{O}_2} - q_{\text{O}_2})$.

Abb. 7. Aktivitäts- p_{H} -Kurven für die Enzyme aus *Alt. tenuis* VII (I) und VI/1 (II). Normalansätze mit 2 cm^3 Rohextrakt: p_{H} 6 u. 7 Phosphatpuffer, p_{H} 8 Phosphat- oder Veronalpuffer, p_{H} 9 Veronal- oder Ammonsalzpuffer. Ia, IIa Enzymeigenatmung (q_{O_2}).

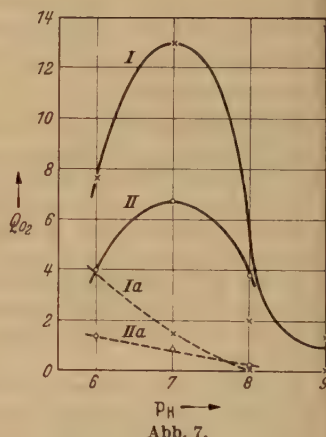


Abb. 7.

Bei p_{H} 8 und 9 zeigt die O_2 -Aufnahme im Versuch mit *Alt. tenuis* VII ausgesprochen autokatalytischen Verlauf⁴⁷; entsprechend liegen die Q_{O_2} -Werte nach 60 min höher, nämlich bei 2,7 bzw. 2,1.

In einigen Versuchen wurde auch die p_{H} -Stabilität des Fermentes beider Quellen untersucht und ebenfalls sehr ähnlich gefunden. Während das Ferment im schwach alkalischen Gebiet (bis p_{H} 9) beständig ist, erfolgt unterhalb des Neutralpunkts beträchtlicher Aktivitätsabfall, und zwar schon bei durchaus noch physiologischen p_{H} -Werten.

⁴⁴ Ganz ähnliche Werte gibt M. Z. GRYNBERG [Biochem. Z. **236**, 138 (1931)] für das tierische Ferment an (Optimum bei $\text{m}/140$, MICHAELIS-Konstante $4,3 \times 10^{-3} \text{m}$).

^{44a} Bei tieferem p_{H} als 6 läßt sich wegen des Ausfallens freier Harnsäure nicht arbeiten.

⁴⁵ R. TRUSZKOWSKI u. S. GUBERMANOWNA: Biochemic. J. **29**, 2787 (1935).

⁴⁶ D. KEILIN u. E. F. HARTREE: Proc. Roy. Soc. Lond. (B) **119**, 114, 141 (1936).

⁴⁷ Noch ausgeprägter ist die Anfangshemmung bei Verwendung von Boratpuffer.

Die Versuche wurden so ausgeführt, daß 2 cm³ Rohextrakt mit 1 cm³ m/7-Veronal-Acetat-Puffer 15 min bei 20° inkubiert wurden. Dann wurde mit n/10-HCl oder NaOH annähernd neutralisiert, Phosphatpuffer p_H 7 und Harnsäure entsprechend dem Normalansatz zugesetzt und die Aktivität in üblicher Weise bei 30° bestimmt.

In Tab 12 sind die nach viertelstündiger Inkubation bei bestimmten p_H-Werten festgestellten Aktivitätsverluste in Prozenten der Ausgangsaktivität verzeichnet.

Tabelle 12.

Aktivitätsverluste (in Prozenten) bei Einwirkung bestimmter p_H-Werte (15 min bei 20°).

p _H	3	4	5	7	9
<i>Alt. tenuis</i> VII	84	72	50	0	0
<i>Alt. tenuis</i> VI/1	88	65	46	0	0

Wahrscheinlich geht auf diese Instabilität im sauren Gebiet die früher (S. 263) erwähnte geringere Uricase-Aktivität auf den potentiell sauren Ammonsalz-Nährböden gegenüber den potentiell alkalischen Nitrat- und Urat-Nährböden zurück.

d) Temperatur-Einfluß.

Es wurde der Einfluß der Temperatur sowohl auf *Aktivität* als auch *Stabilität* der *Alternaria*-Uricasen geprüft.

Im erstenen Falle wurde der O₂-Verbrauch von Normalansätzen mit Rohextrakt im Bereich zwischen 20 und 40° untersucht, im letzteren wurden substratfreie Ansätze zunächst ½ Std im Wasserbad auf Temperaturen zwischen 30 und 55° gehalten und anschließend nach Substratzusatz auf ihre enzymatische Aktivität bei 30° geprüft.

Abb. 8 zeigt *Aktivitäts-Temperatur-Kurven* mit dem deutlichen Temperaturoptimum bei 30°⁴⁸. In Tab. 13 sind (analog Tab. 12) die nach halbstündiger Einwirkung bestimmter Temperaturen feststellbaren Aktivitätsverluste angegeben.

Tabelle 13. Aktivitätsverluste (in Prozenten) bei Einwirkung bestimmter Temperaturen (30 min bei p_H 7).

Temperatur °C	30	40	45	50	55
<i>Alt. tenuis</i> VII	0	24	42	64	97
<i>Alt. tenuis</i> VI/1	0	30	—	—	90

Die (graphisch leicht zu ermittelnde) „*Tötungstemperatur*“ (= Temperatur 50% iger Inaktivierung nach v. EULER⁴⁹) liegt bei etwa 47°.

5. Chemische Beeinflussung der Fermentwirkung durch Inhibitoren.

Im folgenden wird über den Einfluß einer Reihe typischer Inhibitoren desmolytischer Fermente berichtet. Derartige Versuche waren für die

⁴⁸ Literaturangaben für das tierische Ferment liegen zwischen 45° [K. Ro: J. Biochem. (Jap.) 14, 361 (1931)] und 50—55° [F. BATTELLI u. L. STERN: Biochem. Z. 19, 219 (1909)].

⁴⁹ Vgl. z. B. H. v. EULER: Chemie der Enzyme I, 272. München 1925.

Entscheidung der Frage, ob die Uricase unter die Oxydasen oder die Dehydrasen einzureihen sei, von Interesse.

Bekanntlich ist diese Frage für das tierische Ferment immer noch nicht eindeutig entschieden. Für einen Schwermetallgehalt des Ferments spricht die wiederholt angegebene starke Blausäureempfindlichkeit^{46, 50, 51} (90%ige Hemmung durch m/10000-HCN, praktisch vollständige durch m/1000). Damit im Widerspruch steht aber die nur schwache Hemmung durch Natriumazid (30–40% bei m/500) und die praktisch fehlende von Natriumsulfid und Kohlenoxyd.

Die Vermutung, daß die Uricase ein Metall-, im besonderen ein Eisen- oder Zink-Proteid^{50, 51} sei, wird durch neuere Untersuchungen über das Verhältnis von Schwermetallgehalt und Aktivität bei Reinigungsversuchen wenig gestützt^{52, 53}.

In Tab. 14 stehen an erster Stelle die Schwermetallkomplexbildner, dann folgen einige (dehydrasemhemmende) Narcotica und schließlich die spezielleren Fermentgifte Jodessigsäure und Natriumfluorid. Die Hemmungen werden für Rohextrakte aus den beiden *Alternaria*-Stämmen in Prozenten angegeben.

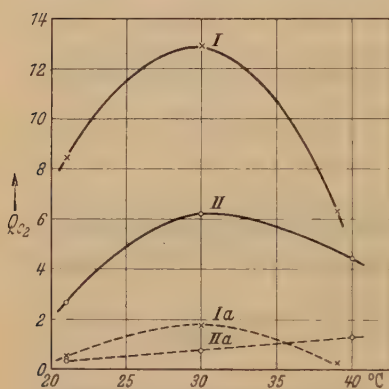


Abb. 8. Temperaturabhängigkeit der Uricasewirkung von *Alt. tenuis* VII (I) und VI/1 (II) Normalansätze mit 2 cm³ Rohextrakt. Ia, IIa Enzymeigenatmung (Q_{0.2}).

Da die Hemmungsgrade manchmal zeitlich etwas veränderlich sind, wurden Mittelwerte aus den Hemmungen nach 15 und nach 60 min gebildet. Nach Möglichkeit wurde im Proportionalitätsbereich der Fermentkonzentration gearbeitet.

Mit den meisten der untersuchten Fermentinhibitoren treten ersichtlich Hemmungen auf, die ihrer Größe nach aber nicht sonderlich charakteristisch sind, besonders wenn man die für solche Versuche zum Teil beträchtlichen Inhibitorkonzentrationen berücksichtigt. Vor allem wurde in keinem Falle eine auch nur annähernd vollständige Hemmung beobachtet. Das ist besonders auffallend bei der Blausäure.

Bei niederen HCN-Konzentrationen tritt übrigens ein gewisser quantitativer Unterschied zwischen den beiden Enzymen in Erscheinung, ebenso wie beim Hydroxylamin: „Uricase II“ zeigt geringere bzw. fehlende Hemmbarkeit bei niedriger Inhibitorkonzentration.

⁵⁰ J. N. DAVISON: Biochemic. J. **32**, 1386 (1938); **36**, 252 (1942).

⁵¹ C. G. HOLMBERG: Biochemic. J. **33**, 1901 (1939).

⁵² L. W. WACHTEL, E. HOVE, C. A. ELVEHJEM u. E. B. HART: J. of Biol. Chem. **138**, 361 (1941).

⁵³ E. PRAETORIUS: Biochim. et Biophys. Acta **2**, 590 (1948).

⁵⁴ Die angegebenen Hemmungen durch Na₂S sind sehr unsicher und bei *Alt. tenuis* VII wahrscheinlich zu hoch, da der beträchtliche und schlecht reproduzierbare Anteil der enzymkatalysierten H₂S-Autoxydation von der Gesamt-O₂-Aufnahme hier wohl nicht ohne weiteres in Abzug gebracht werden darf.

Tabelle 14. Hemmung der *Alternaria-Uricasen* durch typische Inhibitoren. Normalansätze meist mit 1 cm³ Rohextrakt.

Inhibitor	Konzentration	% Hemmung	
		<i>Alt. tenuis</i> VI/1	<i>Alt. tenuis</i> VII
KCN	m/10000	35	7
	m/1000	41	33
	m/500	57	42
	m/200	62	45
	m/100	67	63
Na ₂ S ⁵⁴	m/500	22 ?	48 ?
NaN ₃	m/500	38	33
NH ₂ OH	m/500	29	5
	m/200	39	19
N ₂ H ₄	m/500	32	29
	m/200	38	37
Phenylurethan	m/200	39	37
Phenylharnstoff	m/200	34	31
Na-Jodacetat	m/200	39	32
NaF	m/25	10	18

Die HCN-Empfindlichkeit der Pilz-Uricase ist jedenfalls ungleich geringer als die des tierischen Ferments; selbst m/100-KCN hemmt nur zu etwa $\frac{2}{3}$.

Ein derartiger Hemmungstyp wäre für ein metallhaltiges Oxydationsferment ganz ungewöhnlich. Man wird daran zu denken haben, ob HCN hier nicht als Carbonylgruppen-Inhibitor wirkt, wie das für das Flavın-Proteid Histaminase (Diamin-oxydase) wahrscheinlich gemacht worden ist^{55, 56}. Hierher würden dann gegebenenfalls auch die Hemmungen durch NH₂OH und N₂H₄ gehören.

Eine nicht unbeträchtliche Hemmungswirkung der beiden Narcotica Phenylurethan und Phenylharnstoff ist nicht zu verkennen. Freilich schwanken die Literaturangaben über das Ausmaß der Hemmung für die einzelnen Dehydrasen an sich schon in weiten Grenzen⁵⁷. Die Jodessigsäure-Hemmung (von vergleichbarem Ausmaß) reicht in der beobachteten Höhe nicht aus, um die Pilz-Uricase als typisches Sulfhydryl-enzym erscheinen zu lassen⁵⁸.

Die geringe Fluoridempfindlichkeit des Pilzferments macht NaF zu einem geeigneten Antisepticum, mit dem sich Fermentlösungen einige Tage vor Bakterienbefall schützen lassen.

⁵⁵ Vgl. E. A. ZELLER: *Advanc. enzymol.* **2**, 93 (1942).

⁵⁶ Nach E. WERLE u. A. ZABEL [*Biochem. Z.* **318**, 554 (1948)] wird die pflanzliche Histaminase durch HCN (und andere Carbonylgruppen-Reagenzien) weniger stark gehemmt als die tierische.

⁵⁷ Vgl. *Succino-dehydrase* und *Xanthin-dehydrase* [K. C. SEN: *Biochemic. J.* **25**, 849 (1931)]. Bei der Pilz-*Glucose-oxydase* ist die Narkotica-Hemmung pH-abhängig [W. FRANKE u. F. LORENZ: *Liebigs Ann.* **532**, 1 (1937)].

⁵⁸ Auch das tierische Ferment gehört nicht in diese Gruppe [E. S. G. BARRON u. T. P. SINGER: *J. of Biol. Chem.* **157**, 221, 241 (1945)].

Alles in allem sprechen die Inhibitorversuche noch weniger für eine wahre Oxydase-Natur⁵⁹ der Uricase als es entsprechende Versuche beim tierischen Ferment getan hatten. Eher stützen sie die Dehydrase-Natur des Pilzferments, die durch die Versuche des folgenden Abschnitts als bewiesen angesehen werden kann.

6. Uricase als Aero-dehydrase.

a) Sauerstoff als Wasserstoffacceptor.

Zu den Kriterien der aeroben Dehydrasewirkung gehört die Entstehung des Hydrierungsprodukts Hydroperoxyd. Daß es bei der Wirkung der tierischen Uricase gebildet wird, haben für Rohenzym zuerst KEILIN und HARTREE⁴⁶, für weitgehend gereinigtes später HOLMBERG⁵¹ und DAVIDSON⁵⁰ angegeben.

In der Arbeit von KEILIN u. HARTREE erfolgte der H_2O_2 -Nachweis allerdings nur indirekt (durch den Befund einer sekundären Oxydation von p-Phenyldiamin oder Alkohol). In den Untersuchungen von HOLMBERG und DAVIDSON wurde aus dem Endwert der O_2 -Aufnahme, dem Respirationsquotienten und der Druckänderung bei nachträglicher Katalasezugabe auf die H_2O_2 -Bildung geschlossen.

Wir wiesen bei der aeroben Funktion der *Alternaria*-Uricase H_2O_2 rein chemisch, nämlich durch die Freisetzung von Jod aus angesäuerter Jodidlösung, nach. Infolge der Gegenwart von Katalase in unseren Fermentpräparaten gelang der H_2O_2 -Nachweis nur bei selektiver Vergiftung der Katalase (ähnlich wie im Falle der Glucose-oxydase⁶⁰), wobei wir uns mit Erfolg des Hydroxylamins bedienten.

Die Katalase-Aktivität ist in unseren Enzymlösungen immer wesentlich höher als die der Uricase. Zur Orientierung über das Größenverhältnis bestimmten wir in Ansätzen, die in 5 cm^3 1 cm³ Enzymlösung und 1 cm³ m/30- H_2O_2 (O_2 -Äquivalent 374 mm³) enthielten, bei pH 7 die Geschwindigkeit der H_2O_2 -Spaltung und errechneten aus deren Anfangswert (nach 0,5 min) die Katalase-Aktivität Q'_{O_2} (analog dem Q_{O_2} der Uricase)⁶¹. Tab. 15 enthält eine solche Gegenüberstellung von Uricase- und Katalase-Aktivitäten.

Tabelle 15.

*Uricase-(Q_{O_2}) und Katalase-Aktivität (Q'_{O_2}) von Enzymlösungen aus *Alt. tenuis*.*

	<i>Alt. tenuis</i> VI/1		<i>Alt. tenuis</i> VII
	Rohextrakt	Ammonsulfatfällung	Rohextrakt
Q_{O_2}	9,4	45	8,2
Q'_{O_2}	1350	6550	900

⁵⁹ Im Sinne eines Oxydationsferments mit autooxydablem Metallatom als Wirkgruppe.

⁶⁰ W. FRANKE u. F. LORENZ: Liebigs Ann. **532**, 1 (1937).

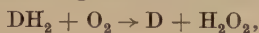
⁶¹ Die in Tab. 15 angegebenen Katalase-Aktivitäten sind Minimalwerte (wegen des etwas überschrittenen Proportionalitätsbereichs der Enzymkonzentration, vgl. S. 275). Die wahren Q'_{O_2} -Werte lägen etwa 1,5–2fach höher.

Das eingesetzte H_2O_2 ist unter den erwähnten Bedingungen in etwa 2 min praktisch vollständig zersetzt. Mit den später meist verwendeten 2 cm³ Enzymlösung reduziert sich diese Zeit auf etwas mehr als 1 min.

Zur quantitativen Bestimmung des gebildeten Hydroperoxyds liefen eine Reihe von gleichen, mit m/500- oder m/200-Hydroxylamin versetzten Warburg-Ansätzen, von denen zu bestimmten Zeiten jeweils einer abgebrochen und mit angesäuerter KJ-Lösung versetzt wurde.

Auf 5 cm³ kamen 2 cm³ 10%iger KJ-Lösung + 1 cm³ 2 n- H_2SO_4 . Nach 30 min wurde das ausgeschiedene Jod mit n/100- $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ aus einer Mikrobürette titriert. Der Berechnung der prozentischen H_2O_2 -Ausbeute werden die um die Eigenatmung des Ferments (die in NH_2OH -Gegenwart nur eine minimale, in Abzug zu bringende Jodausscheidung liefert) korrigierten O_2 -Aufnahmen zugrunde gelegt.

Erfolgt die Substratdehydrierung nach der Gleichung



dann entspricht 1 cm³ n/100- $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (bzw. H_2O_2) 112 mm³ O_2 .

Die ersten, mit m/200- NH_2OH vergifteten Ansätze mit Rohextrakten lieferten H_2O_2 -Ausbeuten von etwa 20—30% der Theorie. Wir geben einige dieser Versuche mit Vorbehalt in Tab. 16 wieder, weil sie wenigstens das gleichartige Verhalten der beiden untersuchten *Alternaria*-Stämme dartun.

Tabelle 16. H_2O_2 -Bildung bei der Harnsäuredehydrierung durch *Alternaria*-Rohextrakte in Gegenwart von m/200- NH_2OH .

Normalansätze mit 2 cm³ (23 bzw. 45 mg Trockengewicht) Enzymlösung.

Zeit (min)	mm ³ O_2	mm ³ O_2 kor.	cm ³ n/100- $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	% H_2O_2 d. Th.
a) <i>Alt. tenuis</i> VI/1.				
30	67	52	0,09	20
60	111	92	0,20	25
90	135	114	0,24	24
b) <i>Alt. tenuis</i> VII.				
30	86	65	0,17	29
60	168	140	0,31	25
90	200	160	0,31	22

Auf der Suche nach einer Erklärung für die schlechten H_2O_2 -Ausbeuten dachten wir anfangs an eine nicht vollständige Hemmung der Katalase; wie spätere Versuche (II. Mitt.⁴²) zeigten, trifft diese Vermutung indes nicht zu. Ferner dachten wir an die (lange bekannte und viel studierte⁶²) nichtenzymatische Reaktion zwischen Harnsäure und H_2O_2 . Aber auch sie spielt unter unseren Versuchsbedingungen offenbar keine nennenswerte Rolle⁴². Wahrscheinlich ist dagegen eine Reaktion zwischen dem (in unnötig hoher Konzentration eingesetzten) Hydroxylamin

⁶² Vgl. z. B. C. S. VENABLE (u. F. J. MOORE): J. Amer. Chem. Soc. **39**, 1750 (1917); **40**, 1099 (1918). — F. CHROMETZKA: Hoppe-Seylers Z. **162**, 219 (1927). — H. WIELAND u. T. F. MACRAE: Hoppe-Seylers Z. **203**, 83 (1931).

und H_2O_2 ⁶³, wobei offenbar nascierendes H_2O_2 noch stärker oxydierend wirkt als zugesetztes, eine Erfahrung, die auch bei enzymatischen Oxydationen des öfteren gemacht worden ist^{66, 64}.

Beim folgenden Versuch mit gereinigtem Ferment (Ammonsulfatfällung) aus Stamm VI/1 wurde daher die NH_2OH -Konzentration auf m/500 reduziert. Auch diese Konzentration ist nach späteren Befunden⁴² noch reichlich bemessen und schließt Sekundärreaktionen nicht ganz aus. Leider ließen sich infolge der mittlerweile erfolgten Degeneration von Stamm VII (S. 267) keine Enzymlösungen von vergleichbarer Aktivität mehr aus diesem gewinnen.

Tab. 17 zeigt das Ergebnis einer Versuchsreihe mit einer Ammonsulfatfällung (Q_{02} 46) aus *Alt. tenuis* VI/1 unter Zusatz von m/500- NH_2OH . Unter diesen (noch nicht ganz einwandfreien und optimalen) Bedingungen wurden also immerhin etwa 70% der theoretischen H_2O_2 -Ausbeute erhalten.

Tabelle 17. H_2O_2 -Bildung bei der Harnsäuredehydrierung durch gereinigtes *Alternariaferment* in Gegenwart von m/500- NH_2OH .

Normalansätze mit 2 cm³ (6,2 mg Trockengew.) Enzymlösung (Ammonsulfatfällung)

Zeit (min)	mm ³ O_2	mm ³ O_2 korrr.	cm ³ n/100- $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	% H_2O_2 d. Th.
30	81	50	0,18	41
60	118	68	0,42	69
120	165	109	0,71	73
150	191	126	0,79	70

H_2O_2 -Bildung und geringe HCN-Empfindlichkeit sind 2 wichtige Argumente gegen eine Metallprotein-Natur der Pilz-Uricase; denn bei der Wirkung (der metallhaltigen) Oxydasen ist bisher nie mit Sicherheit H_2O_2 nachgewiesen worden^{65, 66}, wohl aber bei der Funktion (der metallfreien) Aero-dehydrasen oder Oxhydrasen.

b) Ersatz des Sauerstoffs durch Acceptorfarbstoffe.

Ein weiteres wichtiges Kriterium der Dehydrasenatur eines Ferments ist die Ersetzbarkeit des Sauerstoffs durch andere Wasserstoffacceptoren im Sinne WIELANDS⁶⁷. Die bisher an Rohpräparaten tierischer Uricase

⁶³ Die Oxydation von NH_2OH durch schwache Oxydationsmittel zu N_2O bzw. N_2 ist ebenfalls lange bekannt (vgl. HOFMANN-RÜDORFF: Anorgan. Chem., S. 135. Braunschweig 1951).

⁶⁴ H. WIELAND u. Mitarb.: Liebigs Ann. 477, 32 (1929); 483, 217 (1930).

⁶⁵ Für die *Phenoloxydasen* vgl. Literaturzusammenstellung bei W. FRANKE in NORD-WEIDENHAGEN: Handb. d. Enzymologie II, S. 740 (Leipzig 1940), für *Ascorbinsäure-oxydase* H. STEINMAN u. C. R. DAWSON: J. Amer. Chem. Soc. 64, 1212 (1942); D. B. HAND u. E. C. GREISEN: ebenda 64, 358 (1942).

⁶⁶ Vgl. Zusammenstellung von W. FRANKE in BAMANN-MYRBÄCK: Die Methoden der Fermentforsch. III, S. 2385. Leipzig 1941.

⁶⁷ Vgl. z. B. H. WIELAND: Über den Verlauf der Oxydationsvorgänge. Stuttgart 1933.

durchgeführten Versuche dieser Art (mit Methylenblau und Indophenolen) waren aber im wesentlichen negativ verlaufen^{46, 68}.

Wir fanden bei *Alt. tenuis* VII schon mit Rohextrakten eindeutige Verwertung sowohl von Methylenblau als auch TILLMANS' Reagens (2,6-Dichlorphenol-indophenol). Durch Ammonsulfatfällung ($\frac{3}{4}$ -Sättigung) gereinigtes Ferment erwies sich noch wesentlich aktiver. Tab. 18 zeigt das Ergebnis einer Reihe charakteristischer Entfärbungsversuche.

Die anaeroben THUNBERG-Ansätze (von 4 cm³ Gesamtvolumen) entsprachen im wesentlichen dem aeroben Normalansatz bis auf den Zusatz der beiden Farbstoffe, der so gewählt wurde, daß die Gesamtkonzentration stets m/40000 betrug (Stammlösungen m/2000 bzw. m/4000, davon 0,2 bzw. 0,4 cm³ zugesetzt). In der Tabelle sind t₀ und t die Entfärbungszeiten ohne und mit Substrat, J die daraus berechnete „Dehydrierungsintensität“ nach THUNBERG, $J = 100 (1/t - 1/t_0)$. Die vorletzte Spalte enthält die auf Milligramm Enzym bezogene Dehydrierungsintensität als anaerobes Aktivitätsmaß, die letzte einen Ausdruck für das Verhältnis von anaerober zu aerober Aktivität.

Tabelle 18. Anaerobe Acceptorversuche mit Fermentlösungen aus *Alt. tenuis* VII.

Ferment	Q _{O₂}	cm ³	mg/cm ³	Farbstoff	t ₀ (min)	t (min)	J	J/mg	$\frac{J/mg}{Q_{O_2}}$
Rohextr.	17	2	8,3	Methylenblau	61	14	5,5	0,33	0,017
	17	1	8,3		126	36	2,0	0,24	
Ammon-sulfatf.	82	1	4,1	Desgl.	143	19	4,6	1,12	0,014
Rohextr.	17	2	8,3	Indophe-nol	38	8,5	9,2	0,55	0,034
	17	1	8,3		54	15	4,9	0,59	
Ammon-sulfatf.	82	1	4,1	Desgl.	75	11	7,8	1,90	0,023

Das Indophenol wird etwa doppelt so rasch entfärbt wie Methylenblau, was wahrscheinlich auf das höhere Redoxpotential (vielleicht auch die geringere Toxizität) des ersteren zurückgeht. Bemerkenswert ist noch, daß bei einer Enzymanreicherung auf etwa das 5fache die $\frac{J/mg}{Q_{O_2}}$ -Werte für den gleichen Farbstoff nur in relativ engen Grenzen schwanken. Diese Parallelität der Wirkungen spricht sehr für die Identität des bei Sauerstoff- und Farbstoff-Reduktion tätigen Ferments. Die Verhältnisse erweisen sich demnach als ganz ähnlich wie sie früher bei der Glucoseoxydase der Schimmelpilze gefunden worden waren⁶⁹.

Weniger einheitlich und zum Teil widerspruchsvoll war das Verhalten von Enzymlösungen aus *Alt. tenuis* VI/1. Immerhin vermochten Rohextrakte regelmäßig Indophenol, nicht jedoch Methylenblau als Acceptor

⁶⁸ St. J. PRZYLECKI u. R. TRUSZKOWSKI: C. r. Soc. Biol. Paris 98, 789 (1928).

⁶⁹ W. FRANKE: Liebig's Ann. 555, 111 (1944).

zu verwerten. Tab. 19 zeigt das Ergebnis dreier Versuche mit verschiedenen Extrakten dieses Stammes.

Tabelle 19. *Anaerobe Acceptorversuche mit Rohextrakten aus Alt. tenuis VI/1.*

Ferment (Rohextr.)	Q ₀₂	cm ³	mg/cm ³	Farbstoff	t ₀ (min)	t (min)	J	J/mg	J/mg Q ₀₂
I	8,4	1	12	Methy-	31	39	—	—	—
II	9,1	1	14	lenblau	94	92	—	—	—
III	7,6	1	13	Desgl.	>90	>90	—	—	—
I	8,4	0,5	12	Indophe-	15	10	3,3	0,55	0,065
II	9,1	1	14	nol	25,5	16	2,4	0,17	0,019
III	7,6	1	13	Desgl.	12	8	4,2	0,32	0,042

Wahrscheinlich leidet die quantitative Auswertung dieser Entfärbungsversuche unter der hohen Eigenreduktion der Extrakte.

Überraschenderweise gelang es nicht, aus diesen Rohextrakten durch Ammoniumsulfatfällung (⁹/₁₀-Sättigung) im THUNBERG-Test aktive, gereinigte Fermentlösungen herzustellen, obwohl diese im WARBURG-Versuch Q₀₂-Werte von resp. 45, 48 und 40 lieferten. Methylenblau war auch nach 2 Std in Gegenwart von Substrat und 1 cm³ Enzymlösung noch nicht entfärbt, mit dem Indophenol wurden Entfärbungszeiten zwischen 50 und 70 min beobachtet, wobei mit Harnsäure nur wenig kürzere Zeiten als ohne Substrat erhalten wurden. Wir haben einstweilen keine stichhaltige Erklärung für diesen merkwürdigen Befund, halten aber eine Schädigung an sich schon labilen Ferments durch die Farbstoffe für möglich⁷⁰. Aus äußeren Gründen konnte die Frage bisher nicht weiter verfolgt werden.

Mit weiteren Farbstoffacceptoren, zumeist solchen tieferen Redoxpotentials als dem des Methylenblaus, wurden keine positiven Resultate erhalten.

Wir führten eine derartige Versuchsreihe mit gereinigtem Ferment (Ammoniumsulfatfällung, Q₀₂ 93) aus *Alt. tenuis* VII bei der Farbstoff-Gesamtkonzentration m/10000 durch, die durch die geringe Farbintensität einzelner Farbstoffe (Pyocyanin, Toluylenblau) bedingt war. Die Einstellung der Farbstoff-Stammlösungen erfolgte mit n/100-TiCl₃ (S. 259).

Über das Ergebnis dieser Versuchsreihe orientiert Tab. 20. In der 2. Spalte ist das Redoxpotential der Farbstoffe bei pH 7 (E₀') verzeichnet.

Tabelle 20. *Acceptorversuche mit einer Farbstoffreihe (m/10000) und gereinigter Fermentlösung aus Alt. tenuis VII.*

Farbstoff	E ₀ '	t ₀ (min)	t (min)
2,6-Dichlorphenol-indophenol	0,217	38	12
Toluylenblau	0,115	nicht verwendbar, da mit	
Thionin	0,062	Harnsäure ausfallend	
Methylenblau	0,011	> 600	113
Pyocyanin	— 0,034	34	41
Indigo-disulfonat	— 0,125	41	63
Safranin	— 0,289	> 600	> 600

⁷⁰ Bei dem sonst in allen Punkten ähnlichen Ferment aus *Asp. fumigatus* haben wir diese auffallende Erscheinung nicht beobachtet⁴².

Falls die neuhinzukommenden Farbstoffe nicht aus sekundären Gründen (Niederschlagsbildung mit Harnsäure) unverwendbar sind, werden sie entweder überhaupt nicht oder mit Substrat langsamer als ohne dieses entfärbt.

Soweit das beschränkte Material eine Aussage erlaubt, kehrt bei der Pilz-Uricase offenbar das früher schon bei der Glucose-oxydase beobachtete Verhalten^{29, 60} wieder, daß nämlich nur Farbstoffe relativ hohen Redox-potentials (etwa herab bis zum Methylenblau⁷¹) als Acceptoren wirksam sind⁷². Wie die Glucose-oxydase der Pilze (und eine Reihe anderer Fermente⁶⁶) gehört auch die Uricase in die Gruppe der Oxhydrasen oder Aerodehydrasen mit betonter, wenn auch nicht ausschließlicher Acceptorspezifität zum molekularen Sauerstoff.

Die Mehrzahl dieser Fermente ist heute bereits als Flavin-Proteide erkannt worden⁷³. Nichts spricht einstweilen gegen die Vermutung, daß auch die Uricase sich eines Tages als Flavinferment erweisen wird. Vorbedingung des Nachweises ist weitere systematische Reinigung, die von uns beabsichtigt ist.

7. Zur Frage der Reaktionsprodukte der Uricasewirkung.

Wenngleich die Frage des Reaktionschemismus eingehend erst in folgenden Mitteilungen behandelt werden wird^{42, 74}, sollen hier doch schon einige orientierende Hinweise gegeben werden.

Von vornherein war ein Unterschied zwischen den Produkten der „Uricase I“ und der „Uricase II“ zu erwarten. Für die Wirkung der Uricase I war nach den bisher für pflanzliches Material vorliegenden Literaturangaben (S. 255) in erster Linie an Allantoin als Primärprodukt der Uricolyse zu denken. In der Tat gelang es unschwer, in Warburg-Ansätzen bei Versuchsende mit der Farbreaktion von FOSSE und BOSSUYT (S. 259) Allantoin qualitativ nachzuweisen. Positive Reaktion wurde u. a. erhalten mit Rohextrakten aus *Asp. niger*, *Asp. fumigatus*, *Pen. glaucum*, *Alt. tenuis* VI/1, *Alt. solani*, *Alt. porri*, *Fus. sambucinum* und *Stemphylium* sp.; negativ fiel die Reaktion allein bei *Alt. tenuis* VII aus.

Anschließend wurde bei einigen Pilzen, nämlich *Asp. fumigatus*, *Fus. sambucinum*, *Alt. tenuis* VI/1 und *Alt. tenuis* VII, nach bestimmten O₂-Aufnahmen mittels der im Abschnitt „Methodik“ beschriebenen photometrischen Verfahren eine annähernd quantitative Bestimmung der jeweils noch vorhandenen Harnsäure und des gebildeten Allantoins durchgeführt. Als Fermentpräparate dienten Ammonsulfatfällungen der Rohextrakte, bei *Asp. fumigatus* durch $\frac{2}{3}$, bei den übrigen Pilzen durch $\frac{9}{10}$ -Sättigung erhalten.

⁷¹ Von weitgehend gereinigter Glucose-oxydase wurde auch *Pyocyanin* noch verwertet²⁹.

⁷² Das hat zum mindesten bei der Glucose-oxydase keine thermodynamischen Ursachen [vgl. H. J. STRECKER u. S. KORKES: *Nature* **168**, 913 (1951)].

⁷³ Vgl. neueste Zusammenfassung von H. THEORELL in SUMNER-MYRBÄCK: *The enzymes* II, S. 335. New York 1951.

⁷⁴ W. FRANKE u. E. M. TAHA: *Chem. Ber.* **85**, im Druck (1952).

In Tab. 21 sind Brutto- und (um die Enzymeigenatmung) korrigierte O_2 -Aufnahme (in mm^3), Harnsäureabnahme und Allantoinzunahme (in mg) verzeichnet. Diese Angaben wurden außerdem in Prozente umgerechnet, wobei 100% O_2 224 mm^3 (= 1 Atom O/Harnsäuremolekül), 100% Harnsäure 3,36 mg und 100% Allantoin 3,16 mg entsprechen. (Im Falle von *Alt. tenuis* VII wird der 100%-Wert der O_2 -Aufnahme natürlich überschritten.) Die (direkt miteinander vergleichbaren) Prozentwerte sind durch Fettdruck hervorgehoben.

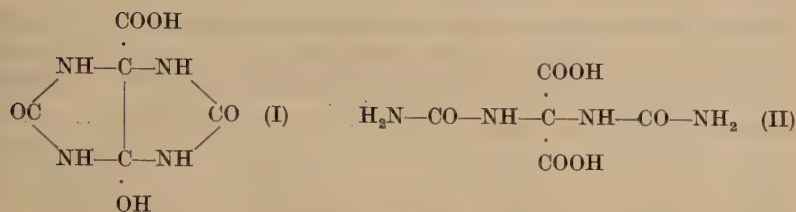
Tabelle 21. Vergleichende Bestimmung von O_2 -Aufnahme, Harnsäureschwund und Allantoinbildung mit gereinigten Fermentlösungen.

Zeit (min)	$mm^3 O_2$	$mm^3 O_2$ korr.	% O_2	Harnsäureabnahme (mg)	% Harnsäureabnahme	Allantoin (mg)	% Allantoin
a) <i>Asp. fumigatus</i> 26 (Q_{O_2} 52).							
15	68	63	28	1,04	31	0,78	25
30	110	102	46	1,78	47	1,55	49
90	180	172	77	2,80	83	2,85	90
b) <i>Fus. sambucinum</i> (Q_{O_2} 75).							
15	51	39	17	0,46	14	0,58	18
90	178	142	64	2,86	85	2,50	79
180	256	217	97	3,21	96	3,05	97
c) <i>Alt. tenuis</i> VI/1 (Q_{O_2} 33).							
15	60	49	22	0,79	24	0,93	29
75	176	149	67	2,42	72	2,00	63
180	255	212	95	3,14	94	3,05	97
d) <i>Alt. tenuis</i> VII (Q_{O_2} 55).							
60	152	142	63	1,50	45	0	0
120	232	207	92	2,40	71	0	0
180	325	290	(130)	2,90	86	0	0

Wenn auch die Bestimmungsmethoden für Harnsäure und besonders Allantoin nicht sonderlich genau sind, so läßt sich doch für die 3 an erster Stelle stehenden Organismen mit einiger Sicherheit sagen, daß bei Aufnahme eines Sauerstoffatoms ein Molekül Harnsäure verschwindet und offenbar ein Atom Allantoin gebildet wird. Davon abweichend bleibt bei *Alt. tenuis* VII die Harnsäureabnahme hinter der O_2 -Aufnahme zurück und Allantoin ist als Reaktionsprodukt nicht nachweisbar, auch nicht bei den O_2 -Aufnahmen unter einem Sauerstoffatom je Harnsäuremolekül.

Auch für die Fälle positiver Allantoinreaktion muß hier noch darauf hingewiesen werden, daß nach SCHULER u. REINDEL⁷⁵ die Farbreaktion von FOSSE u. BOSSUYT nicht für Allantoin spezifisch ist, sondern auch von Oxyacetylen-diurein-carbonsäure (I) und Uroxansäure (II) gegeben wird:

⁷⁵ W. SCHULER u. W. REINDEL: Hoppe-Seylers Z. 208, 248 (1932).



Beide Verbindungen, von denen die erste seit langem als Primärstufe der tierischen Uricolyse angenommen wird⁷⁶, treten nach neueren Untersuchungen von KLEMPERER⁷⁷ und PRAETORIUS⁷⁸ bei tierischem Ferment auch als Endprodukte neben dem Allantoin auf, wobei ihre Menge stark von pH und Puffersubstanz abhängig ist. Da aber beide Säuren zum Unterschied vom Allantoin noch die C-Zahl der Harnsäure besitzen, werden Bestimmungen des Respirationsquotienten (evtl. auch der NH₂-Gruppen), die zur Zeit durchgeführt werden, auch beim Pilzferment zweifellos eine Entscheidung erlauben.

Die Farbreaktion von FOSSE u. BOSSUYT ist in der üblichen Ausführungsform auch insofern unspezifisch, als sie nicht zwischen Allantoin und Allantoin-säure (bzw. Glyoxylsäure) zu unterscheiden gestattet. Diese Unterscheidung wird jedoch ermöglicht, wenn man sich allein auf die saure Hydrolyse des Reaktionsprodukts beschränkt. Derartige Bestimmungen wurden von uns am Ende der in Tab. 21 enthaltenen Versuche ausgeführt. Die dabei beobachteten minimalen Rotfärbungen könnten Allantoin-säuremengen von der Größenordnung eines Prozents entsprechen. Eine Allantoinase kommt in unseren Enzympräparaten also höchstens spurenweise vor⁷⁹.

Von besonderem Interesse war natürlich der Fall der „Uricase II“. Wenn bei ihrer Wirkung Allantoin als Zwischenprodukt auch nicht gefaßt werden konnte, so war seine intermediäre Bildung doch nicht ausgeschlossen, wenn es nämlich selbst als Substrat weiterer Oxydation dienen konnte. Dies ist nun in der Tat der Fall. Extrakte aus *Alt. tenuis* VII — und einstweilen nur aus diesem Stamm — zeigen die neuartige enzymatische Fähigkeit, Allantoin zu oxydieren, und zwar mit einer Geschwindigkeit, die etwa 80% von derjenigen der Harnsäureoxydation ausmacht. In der folgenden Tab. 22 geben wir einen derartigen Versuch mit einem Rohextrakt aus *Alt. tenuis* VII (Q₀, 12,9) wieder.

Erwartungsgemäß nimmt Allantoin etwa 1 Atom O je Molekül auf.

Über die chemische Natur des Endprodukts lassen sich einstweilen nur Vermutungen äußern. Immerhin ist der Kreis der in Betracht kommenden Verbindungen begrenzt. Der chemischen Struktur der Harnsäure bzw. des Allantoins entsprechend kann die weitere Oxydation sich

⁷⁶ W. SCHULER (u. W. REINDEL): Hoppe-Seyler's Z. **208**, 237 (1932); **215**, 258 (1933).

⁷⁷ F. W. KLEMPERER: J. of Biol. Chem. **160**, 111 (1945).

⁷⁸ E. PRAETORIUS: Biochim. et Biophys. Acta **2**, 602 (1948).

⁷⁹ Auch BRUNEL² konnte Allantoinase in *Asp. niger*-Mycel nur nachweisen, wenn es auf BERTRANDScher, nicht dagegen, wenn es auf CZAPEK'Scher Nährlösung gezüchtet worden war.

Tabelle 22. Vergleich der Harnsäure- und der Allantoin-Oxydation durch Rohextrakt aus *Alt. tenuis* VII.Normalansätze mit m/250-Harnsäure bzw. Allantoin und 2 cm³ (31 mg Trockengew.) Enzymlösung.

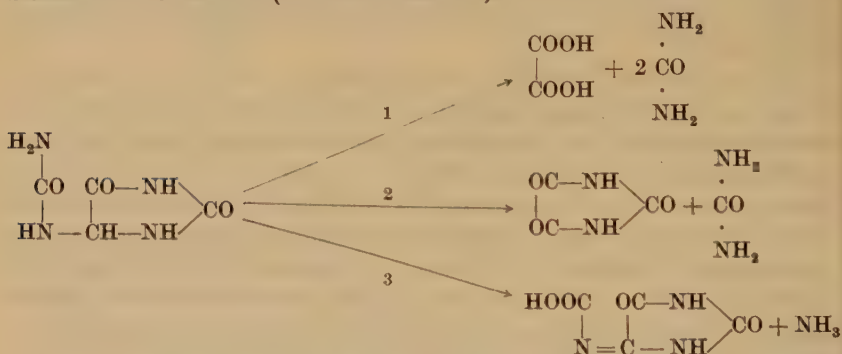
Substrat Zeit (min)	ohne	Harnsäure	Allantoin
15	12	100	84
30	26	170	144
60	36	228	187
90	40	245	198
120	43	268	219
150	46	296	230
180	48	326	242

nur auf die beiden miteinander verbundenen C-Atome beziehen. 3 Möglichkeiten erscheinen denkbar:

1. Es entstehen unter oxydativer Ringsprengung Oxalsäure und Harnstoff⁸⁰.

2. Es entstehen unter oxydativer Abspaltung der Seitenkette Parabansäure und Harnstoff.

3. Es entsteht unter Dehydrierung und Abspaltung von Ammoniak aus der Seitenkette Oxonsäure (Allantoxansäure).



Die oxydative Bildung von Oxalsäure aus Allantoin ist chemisch nicht sonderlich wahrscheinlich. Die viel näher liegende hydrolytisch-oxydative (über Glyoxylsäure) kommt wegen des Ausfalls der Allantoinasewirkung nicht in Frage. Die Möglichkeiten 2 und 3 erscheinen chemisch ziemlich gleichwertig. Wir sind einstweilen geneigt, die Bildung von Oxonsäure für den wahrscheinlicheren Reaktionsweg zu halten*.

⁸⁰ Entstehung von Oxalsäure und Harnstoff neben Allantoin haben H. KLEIN-MANN u. H. BORK [Biochem. Z. **262**, 20 (1933)] für das Leberferment angegeben. Die O₂-Aufnahme wurde allerdings nicht gemessen. Unseres Wissens ist es die einzige Literaturangabe, nach der für die tierische Uricolyse ein über 1 Atom O je Harnsäure-Molekül hinausgehender O₂-Verbrauch anzunehmen wäre.

* Anmerkung bei der Korrektur: Neuere Bestimmungen des Respirationsquotienten und der NH₃-Bildung bestätigen diese Auffassung.

Denn für sie ist schon lange bekannt, daß sie — ähnlich wie die anderen Produkte der Uricolyse (Oxyacetylen-diurein-carbonsäure, Uroxansäure, Allantoin) — bei der alkalischen Oxydation von Harnsäure auf rein chemischem Wege — sei es mit O_2 ^{81, 82}, sei es mit $KMnO_4$ ^{81, 83} — leicht zu erhalten ist.

Sollte — was noch exakt nachzuweisen wäre — Allantoin tatsächlich als Zwischenprodukt bei der „Uricase II“-Wirkung auftreten, dann würde sich weiter die Frage erheben, ob die Allantoinoxydation noch in den Spezifitätsbereich dieser besonderen Uricase fällt oder aber durch eine eigene, mit „Uricase I“ vergesellschaftete Allantoin-oxydase bzw. -aerodehydrase zustande kommt. Im ersteren Fall würde es 2 verschiedene Pilz-Uricasen unterschiedlicher Spezifität hinsichtlich des Reaktionsprodukts geben, wofür unseres Wissens bei Oxydationsfermenten bisher kein Präzedenzfall vorliegt. Andererseits erlaubt das in vorausgehenden Abschnitten beigebrachte Material noch keinen sicheren Schluß auf eine zusammengesetzte Natur der „Uricase II“.

Gewisse Unterschiede zwischen den beiden Uricasetypen waren z. B. aufgetreten hinsichtlich der Empfindlichkeit gegen niedere HCN - und NH_2OH -Konzentrationen (S. 278) sowie im Verhalten gegenüber Farbstoffen (S. 283/4). Ob die quantitativen Unterschiede bei der Fällung mit Ammonsulfat, wie sie zwischen *Asp. fumigatus* und *Alt. tenuis* VII aufgetreten waren (S. 272), sich auf die Species oder den Fermenttyp beziehen, bedarf noch gesonderter Untersuchung⁸⁴. Die Aufklärung der wahren Natur von „Uricase II“ kann wohl nur durch weitere Fermenttrennungs- und -reinigungversuche erzielt werden, die allerdings einstweilen durch die Degeneration unseres *Alt. tenuis*-Stamms VII sehr erschwert sind. Vielleicht führen geplante Versuche mit Einzellkulturen wieder zu aktivem Mycelmaterial.

Der *Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft* sind wir für finanzielle Förderung dieser Untersuchung sehr zu Dank verpflichtet.

Zusammenfassung.

1. Eine Reihe von Schimmelpilzen der Gattungen *Mucor*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* und *Alternaria* zeigten in CZAPEK-DOX-Nährlösung mit Harnsäure als einziger Stickstoffquelle gutes bis sehr gutes Wachstum.

2. Im Gegensatz zu älteren Befunden von BRUNEL (1939) an *Asp. niger* gelang es, in Mycelpulver und Wasserextrakten zerkleinerten Mycels — in den meisten Fällen auch, wenn dieses auf nitrathaltiger CZAPEK-DOX-Lösung gezüchtet worden war — eine lösliche Uricase nachzuweisen. In den meisten der untersuchten Schimmelpilzarten ist

⁸¹ H. BLITZ u. R. ROBL: Ber. dtsh. chem. Ges. **53**, 1967 (1920).

⁸² W. SCHULER u. W. REINDEL: Hoppe-Seylers Z. **215**, 258 (1933).

⁸³ E. E. SUNDWIK: Hoppe-Seylers Z. **20**, 335 (1895).

⁸⁴ Soweit ein Vergleich der Fermente aus *Alt. tenuis* VI/1 und *Asp. fumigatus* (über welch letzteres in der II. Mitteilung eingehend berichtet werden wird) möglich ist, ist zwischen ihnen ein Unterschied nicht festzustellen.

Uricase als konstitutives Ferment enthalten. In zahlreichen Gattungen und Arten der Phycomyceten, Ascomyceten und der Fungi imperfecti erwies sie sich als außerordentlich verbreitet.

3. Die Uricase-Aktivität ist am höchsten in jungem (2—3-tägigem) Mycel; 8—10 Tage altes Mycel zeigt fast keine Wirksamkeit mehr. Durch Ammonsulfatfällung und Dialyse wurde die Pilz-Uricase bisher maximal 25fach (bis zu Q_{O_2} -Werten von 130) angereichert. Auch ließen sich durch Alkohol-Äther- oder Aceton-Fällung von Mycelextrakten Trockenpräparate von einer gewissen, wenn auch begrenzten Haltbarkeit herstellen.

4. Von Fermentlösungen der verschiedensten Herkunft wird pro Harnsäuremolekül 1 Atom Sauerstoff aufgenommen. Allein das Ferment aus einem (ägyptischen) *Alt. tenuis*-Stamm (VII) übertrug die doppelte O_2 -Menge. Die beiden Fermenttypen werden einstweilen als „Uricase I“ und „Uricase II“ unterschieden.

5. Die Kinetik der beiden Fermenttypen wird an 2 Stämmen von *Alt. tenuis* (VI/1 und VII) näher untersucht. Es zeigen sich keine wesentlichen Unterschiede. Das pH -Optimum liegt bei pH 7, das Substratoptimum bei $m/100$, die MICHAELIS-Konstante bei $3 \cdot 10^{-3} m$, das Temperaturoptimum bei 30° , die „Tötungstemperatur“ bei 47° . Das Ferment ist im schwach alkalischen, nicht im schwach sauren Gebiet beständig.

6. Das Verhalten der Pilz-Uricasen gegen Inhibitoren ist wenig charakteristisch. Blausäure hemmt noch am stärksten, aber vielschwächer als beim tierischen Ferment; selbst $m/100$ -HCN hemmt erst zu $2/3$. Auch Narcotica wirken hemmend. Das Hemmungsverhalten spricht eher für die Dehydrase- als eine (Metall-)Oxydase-Natur der Pilz-Uricase.

7. In die gleiche Richtung weist die Tatsache, daß bei Vergiftung der in den Enzympräparaten stets vorhandenen Katalase (z. B. mit Hydroxylamin) Hydroperoxyd als Reaktionsprodukt nachgewiesen werden kann. Ferner kann der Sauerstoff auch durch einige Acceptorfarbstoffe (2,6-Dichlorphenol-indophenol, Methylenblau) unter anaeroben Bedingungen ersetzt werden, was für die tierische Uricase bisher nicht mit Sicherheit festgestellt war. Verschiedene andere Farbstoffacceptoren (von meist dem Methylenblau unterlegenem Redoxpotential) waren wirkungslos. Die Pilz-Uricase gehört wie die früher von FRANKE und Mitarbeitern untersuchte sogenannte Glucose-oxydase aus *Aspergillus* und *Penicillium* in die Gruppe der relativ acceptorspezifischen Aerodehydrasen oder Oxhydrasen. Vielleicht ist auch sie ein Flavinferment.

8. Durch die Farbreaktionen von FOLIN u. WU sowie FOSSE u. BOSSUYT wurde für „Uricase I“ wahrscheinlich gemacht, daß pro aufgenommenes Sauerstoffatom ein Molekül Harnsäure verschwindet und ein Molekül Allantoin gebildet wird. Bei „Uricase II“ erfolgt der

Harnsäureschwund, bezogen auf die O_2 -Aufnahme, langsamer und Allantoin ist nicht nachweisbar. Trotzdem kommt es als Zwischenprodukt in Frage, da „Uricase II“ im Gegensatz zu „Uricase I“ Allantoin nur wenig langsamer als Harnsäure zu oxydieren vermag. Die Frage, ob „Uricase II“ ein eigenes Ferment oder ein Komplex von „Uricase I“ + „Allantoinoxydase“ ist, kann noch nicht entschieden werden.

9. Die mutmaßlichen Reaktionsprodukte der „Uricase II“-Wirkung werden diskutiert. Es kommen in erster Linie Oxalsäure, Parabansäure und Oxonsäure (Allantoxansäure) in Betracht (neben Harnstoff bzw. NH_3). Aus chemischen Gründen wird Oxonsäure einstweilen als wahrscheinlichstes Reaktionsprodukt angesehen.

(Aus dem Botanischen Garten der Stadt und dem Botanischen Institut der Universität Köln.)

Über Ursachen des verstärkten Auftretens von erdbewohnenden Cyanophyceen.

Von

R. KNAPP und H. LIETH.

(Eingegangen am 25. April 1952.)

Über die Gründe, die das Auftreten von erdbewohnenden Cyanophyceen bedingen, ist bisher noch wenig Sicheres bekannt geworden.

Aus vergleichenden Betrachtungen läßt sich erschließen, daß diese Formen — wenigstens während ihrer Hauptentwicklungszeit — hohe Luftfeuchtigkeit und eine nur verhältnismäßig selten unterbrochene Durchfeuchtung der Bodenoberfläche benötigen. Manche von ihnen bevorzugen zudem offensichtlich hohe Nährsalzkonzentrationen; denn sie treten in der Nähe von Abwasserrinnen, Jauchegruben usw. besonders reichlich auf (namentlich *Oscillatoria* div. spec.). Diese Beobachtungen decken sich mit den Untersuchungsergebnissen von ESMARCH (1914), in denen außerdem eine Vorliebe der Erdcyanophyceen für bearbeitete Böden nachgewiesen wurde, die wohl auf deren Nährstoffreichtum zurückzuführen ist.

Beobachtungen über Faktoren, die das Auftreten von Cyanophyceen begünstigen, konnten im Verlaufe von eigenen Versuchen gemacht werden, in welchen die Wirkung verschiedener Mineralsalze und Mineralsalzkombinationen auf das Wachstum bestimmter Pflanzenarten und insbesondere auf deren gegenseitige Beeinflussung (Konkurrenz usw.) festgestellt werden sollte.

Die Versuchsgefäße (113 cm² Oberfläche, etwa 750 cm³ Boden-Inhalt) wurden am 24. 4. 1951 mit Rasenboden gefüllt. Dieser bestand aus dunkel braun-grauem, durchwurzelterm, gut gekrümeltem, feinsandigem Lehm mit 3% Skelett-Anteilen (Grobkies) und 5,45% Humusgehalt. Bei Beginn des Versuches besaß er eine Bodenreaktion (p_H) von 6,9 in Wasser (6,7 in KCl). Im Laktatauszug (nach EGNÉR, p_H 3,7) konnten 18,5 mg P₂O₅ je 100 g Boden (lufttrocken) ermittelt werden. Im wäßrigen Bodenextrakt waren jedoch nur 2,75 mg P₂O₅ je 100 g Boden nachzuweisen. Die Phosphorsäure war also offensichtlich ziemlich fest im Boden bei der diesem eigenen Reaktion gebunden. Die Versuchsgefäße standen in einem mit Glasfenstern überdeckten, gut belüfteten Anzuchtkasten. Durch häufiges Wässern wurde erreicht, daß die Durchfeuchtung der Bodenoberfläche höchstens kurzfristig unterbrochen war. Die Wärmeverhältnisse im Anzuchtkasten dürften dank der guten Durchlüftung weitgehend den Außentemperaturen entsprochen haben. Einem Teil der Versuchsgefäße wurden am 7. 6., 21. 6., 28. 6. und 6. 7. bestimmte Mengen Ammoniumnitrat, Calciumphosphat und Kaliumchlorid zugegeben (genaue Mengenangaben in Tab. 1; die Zahlen in ihrer Überschrift bezeichnen die Gaben je Versuchsgefäß). Unmittelbar nach der Einfüllung des Rasenbodens wurden in die Versuchsgefäße Blütenpflanzen eingesät (*Lolium perenne*, *Festuca rubra* und *Trifolium repens* in Reinsaat und miteinander gemischt).

Vom Zeitpunkt der Einfüllung des Bodens und der dieser unmittelbar folgenden Einsaat an konnten sich die Algen ungestört entwickeln. Zur Zeit der hier mitgeteilten Ausbreitung der Cyanophyceen waren die Töpfe mit Ausnahme der nicht mit Ammoniumnitrat behandelten, ausschließlich mit *Lolium perenne* und *Festuca rubra* besäten Gefäße (hier nur 12—40% Deckungsanteile) von einem meist mehr als 70% der Fläche bedeckenden, oft dicht schließenden Rasen aus den genannten Grasarten und Weißklee bedeckt.

Nach einigen Wochen zeigte sich ein sehr unterschiedliches Auftreten von Cyanophyceen in den einzelnen Versuchsgefäßen. Tab. 1 zeigt, welche Flächenanteile der Versuchsgefäße auf Grund einer makroskopischen Bestimmung von Cyanophyceen-Kolonien bedeckt waren und wieviel Prozent des Bodens von den Gräsern und *Trifolium repens* bedeckt wurde. Jeder mitgeteilte Wert gründet sich auf Untersuchungen an 3 gleichbehandelten Gefäßen (Durchschnittswerte am 8., 12. und 23. Juli). Eine reiche Entwicklung von Cyanophyceen trat nur auf den Gefäßen auf, die Calciumphosphat und Kaliumchlorid erhielten; von den so behandelten Töpfen waren nur diejenigen weitgehendst frei von Cyanophyceen, die alle 3 Arten von Blütenpflanzen trugen (also gleichzeitig *Lolium perenne*, *Festuca rubra* und *Trifolium repens*). Bei Ausschluß dieser letztgenannten Blütenpflanzenkombination ergibt sich somit, daß bei den mit Calciumphosphat und Kaliumchlorid behandelten Versuchsgefäßen im Durchschnitt 37,6% der Bodenoberfläche mit Cyanophyceen bedeckt ist, während in den nicht mit diesen Salzen behandelten Gefäßen dieser Wert nur 0,66% beträgt. Das Auftreten ist also im ersten Falle im Durchschnitt mehr als 50mal so stark.

Unterschiedliche Ammoniumnitratgabe bedingte dagegen keine verschiedene Ausbreitung der Cyanophyceen. Selbst der durch verstärkte Stickstoffgabe bewirkte dichtere Wuchs der Blütenpflanzen hemmte die Massenausbreitung der Blaualgen nicht. Hierdurch wird die große Indifferenz der Cyanophyceen gegenüber unterschiedlicher Lichtversorgung (BORESCH 1913, SCHINDLER 1913, HARDER 1917, 1923, ZIMMERMANN 1928, GEITLER 1928) erneut veranschaulicht. Diese Indifferenz wird wohl durch die Möglichkeit heterotropher Lebensweise im Dunkeln ermöglicht. Aus der gleichen Unempfindlichkeit gegenüber starker Beschattung und aus dem mangelnden Einfluß verbesserter Stickstoffversorgung dürfte es zu erklären sein, daß die Werte der von den Cyanophyceen bedeckten Flächen bei den mit dem stark schattenden und stickstoff-anreichernden Weißklee und Klee-Gras-Gemischen besäten Töpfen nicht wesentlich von denen differieren, die in den Versuchsgefäßen mit den viel lichtdurchlässigeren reinen Gramineenbeständen gefunden wurden. Es kann also der Schluß gezogen werden, daß anorganische Stickstoffverbindungen für das Auftreten mancher erdbewohnender Cyanophyceen von keiner großen Bedeutung sind.

Voraussetzung für die Entwicklung der Cyanophyceen dürfte allerdings ein gewisser minimaler Stickstoffgehalt des Substrates sein. Denn wie die Versuche von PRINGSHEIM (1913) nachwiesen, ist der Stickstoffbedarf der Cyanophyceen relativ höher als der nach den anderen Grundnährstoffen. Das zeigt auch die von HARDER (1917) verwendete Nährlösung. Jedoch besitzen die Cyanophyceen offenbar ein sehr großes Aneignungsvermögen für Stickstoff und können vor allem auch in höherem Maße als die meisten anderen Pflanzen organisch gebundenen Stickstoff verwerten. Nach RICHTER (1911) und PRINGSHEIM (1913) gehören sie zu den wenigen Pflanzen, welche ihren gesamten Stickstoffbedarf aus Agar-Agar bestreiten können. Neuerdings wird sogar wieder eine Assimilation von atmosphärischem Stickstoff angenommen (WINTER 1935, DE 1939, vgl. auch ALLEN 1952), eine Hypothese, die am Ende des vorigen und am Anfang dieses Jahrhunderts dominierte (z. B. PRANTL 1889, KOCH und KOSSOWITSCH 1893, BEIJERINCK 1901, JAMIESON 1907).

Tabelle 1. Prozentuale Flächenbedeckung der Versuchsgefäßoberfläche mit Blütenpflanzen (Blpfl.) und Cyanophyceen (Cyanoph.).

Lfd. Nr.	Blütenpflanzen-Einsaat und Salzgaben	Blpfl. %	Cyanoph. %	Lfd. Nr.	Blpfl.-Einsaat und Salzgaben	Blpfl. %	Cyanoph. %
1.	<i>Lolium perenne</i> — . . .	33	—	25.	<i>Lolium</i> + <i>Trifolium</i> — .	99	—
2.	„ „ N1 . . .	91	—	26.	„ „ N1	100	1
3.	„ „ N2 . . .	98	—	27.	„ „ N2	100	—
4.	„ „ PK . . .	22	65	28.	„ „ PK	100	51
5.	„ „ N1PK . . .	92	50	29.	„ „ N1PK	100	27
6.	„ „ N2PK . . .	100	18	30.	„ „ N2PK	100	3
7.	<i>Festuca rubra</i> — . . .	16	—	31.	<i>Festuca</i> + <i>Trifolium</i> — .	100	5
8.	„ „ N1 . . .	35	—	32.	„ „ N1 .	92	1
9.	„ „ N2 . . .	99	2	33.	„ „ N2 .	98	—
10.	„ „ PK . . .	13	39	34.	„ „ PK .	100	37
11.	„ „ N1PK . . .	37	26	35.	„ „ N1PK .	100	18
12.	„ „ N2PK . . .	98	78	36.	„ „ N2PK .	100	12
13.	<i>Trifolium repens</i> — . . .	100	2	37.	<i>Lolium</i> + <i>Festuca</i> + <i>Trifolium</i> — .	74	1
14.	„ „ N1 . . .	100	1	38.	dto. N1 . . .	99	2
15.	„ „ N2 . . .	100	—	39.	dto. N2 . . .	100	—
16.	„ „ PK . . .	100	40	40.	dto. PK . . .	75	3
17.	„ „ N1PK . . .	100	47	41.	dto. N1PK	100	5
18.	„ „ N2PK . . .	100	21	42.	dto. N2PK	100	—
19.	<i>Festuca</i> + <i>Lolium</i> — . . .	22	—				
20.	„ „ N1 . . .	59	—				
21.	„ „ N2 . . .	98	—				
22.	„ „ PK . . .	19	63				
23.	„ „ N1PK . . .	77	77				
24.	„ „ N2PK . . .	100	5				

N1 = $4 \times 0,085$ g NH_4NO_3 PK = $4 \times 0,14$ g $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ und $4 \times 0,095$ g KCl.
 N2 = $4 \times 0,34$ g NH_4NO_3 — = keine Salzgabe

Von großer Bedeutung ist nach unseren Versuchen für die Massenausbreitung einiger erdbewohnender Cyanophyceen ein Überschuß an Phosphorsäure- und Kalium-Verbindungen, eventuell auch der mit

diesen zusammen gegebenen Stoffe (Chlor und Calcium). Das Fehlen von großen Kolonien von Cyanophyceen auf zwar mit Kalium und Phosphorsäure behandelten, jedoch zugleich 3 Arten von Blütenpflanzen tragenden Versuchsgefäßen könnte daraus zu erklären sein, daß durch den vielseitiger zusammengesetzten Pflanzenbestand eine bessere Ausnutzung der Nährstoffe durch die Klee-Gras-Gesellschaft vorliegt und daher nicht mehr der zum guten Gedeihen der Cyanophyceen notwendige Nährsalzüberschuß vorhanden ist.

In einem Drittel der Versuchsgefäße wurde eine *Analyse der Mikroflora der Bodenoberfläche* vorgenommen. Das Vorkommen der am häufigsten gefundenen Arten ist in Tab. 2 mitgeteilt. Die Zahlen bezeichnen Bedeckungsgrade nach der von BRAUN-BLANQUET (1928) angegebenen und von KNAPP (1948/49) ergänzten Skala.

Infolge der mikroskopischen Untersuchung konnten auch Einzelvorkommen von Algen berücksichtigt werden, die in Tab. 1 nicht in Erscheinung treten, da sie makroskopisch unsichtbar bleiben¹. In weniger als 5 Versuchsgefäßen wurden außerdem noch folgende Cyanophyceen gefunden: *Aphanocapsa Grevillei* (HASS.) RABH.; *Oscillatoria limosa* KÜTZ.; *Oscillatoria Annae* VAN GOOR; *Synechococcus elongatus* NAEGELI.

Desgleichen wurden mit geringerer Regelmäßigkeit einige Diatomeen beobachtet, die mit denen von Herrn Dr. HUSTEDT gefundenen Arten in folgender Liste vereinigt sind:

<i>Achnanthes coarctata</i> BRÉB.	<i>Nitzschia amphibia</i> GRUN.
„ <i>lanceolata</i> BRÉB.	„ <i>communis</i> RABH.
„ <i>minutissima</i> KÜTZ.	„ <i>debilis</i> ARN.
<i>Amphora montana</i> KRASSKE	„ <i>perminuta</i> GRUN.
<i>Diatoma vulgare</i> BORY	„ <i>stagnorum</i> RABH.
<i>Gomphonema parvulum</i> KÜTZ.	<i>Pinnularia borealis</i> E.
<i>Hantzschia amphioxys</i> (E.) GRUN.	„ <i>microstauron</i> var.
<i>Navicula contenta</i> f. <i>biceps</i> ARN.	<i>Brebissonii</i> (KÜTZ.) HUST.
„ <i>hungarica</i> var. <i>capitata</i>	<i>Pinnularia obscura</i> KRASSKE
(E.) CL.	„ <i>stomatophora</i> GRUN.
„ <i>insociabilis</i> KRASSKE	<i>Surirella ovata</i> KÜTZ.
„ <i>mutica</i> var. <i>nivalis</i> (E.) HUST.	<i>Synedra ulna</i> (NITZSCH) EHR.
„ <i>tantula</i> HUST.	

Aus der Tab. 2 ergibt sich, daß eine deutliche Bevorzugung der mit Kaliumchlorid und Calciumphosphat behandelten Töpfe nur bei den beiden am reichlichsten auftretenden Algenformen, *Nostoc sphaericum* und *Cylindrospermum licheniforme*, zu beobachten war. Aber auch diese beiden Formen traten ebenso wie die übrigen in der Tabelle genannten

¹ Die Diatomeen wurden von Dr. F. HUSTEDT, Plön, revidiert. Ihm sei auch an dieser Stelle vielmals für diese Bearbeitung gedankt.

Algen in geringerer Menge in den nicht mit Kalium- und Phosphorsäureverbindungen behandelten Gefäßen auf.

Die Keime der Algen sind vermutlich größtenteils mit dem Gießwasser, das einem Sammelbehälter entnommen wurde, auf die Töpfe gelangt. Denn eine Untersuchung der Algenflora des Wassers dieses Sammelbehälters ergab, daß die meisten in der Tab. 2 genannten Arten dort

Tabelle 2. Mikroflora der Bodenoberfläche von Versuchsgefäßen. 5 = 75—100%, 4 = 50—als 5%, + = wenig, r = 1—5

	<i>Lolium perenne</i>						<i>Festuca rubra</i>						<i>Trifolium repens</i>					
	—	N1	N2	PK	N1 PK	N2 PK	—	N1	N2	PK	N1 PK	N2 PK	—	N1	N2	PK	N1 PK	N2 PK
Cyanophyceae:																		
<i>Nostoc sphaericum</i>																		
VAUCH.	r	+	.	5	3	3	1	+	.	2	1	+	+	.	.	1	3	2
<i>Cylindrospermum licheniforme</i> (BORY) KÜTZ.	.	.	.	2	1	1	.	.	.	2	.	1	+	1	.	3	2	2
<i>Oscillatoria brevis</i> KÜTZ.	r	.	.	1	+	1	+	+	1	1	+	2	+	+	+	1	1	1
<i>Symploca dubia</i>																		
(NAEGELI) GOMONT.	r	.	.	+	r	+	.	.	1	+	+	+	r	.	.	+	+	+
<i>Chroococcus varius</i>																		
A. BRAUN	r	1	r	1	.	.	r	1	.	+	+	r	.	+	+	+
Diatomeae:																		
<i>Eunotia pectinalis</i>																		
(KÜTZ.) RABENH.	r	r	+	+	+	r	+	+	+	+	.	+	+	+	r	+	r	r
<i>Navicula cryptocephala</i>																		
KÜTZ.	+	r	.	+	r	.	.	+	r	+	.	+	+	r
<i>Navicula mutica</i> KÜTZ.	.	r	+	+	r	.	.	r	r	+	r	+	.	r	.	+	.	.
<i>Navicula cincta</i>																		
(E.) KÜTZ.

vorhanden waren. Von den Cyanophyceen, insbesondere von *Nostoc sphaericum* und *Cylindrospermum licheniforme*, konnten also zwar durchaus auf alle Töpfe Thalli bzw. Vermehrungsorgane gelangen, diese fanden jedoch nur auf den mit Calciumphosphat und Kaliumchlorid behandelten Töpfen genügend günstige Bedingungen für eine kräftige Ausbreitung.

Zur weiteren Untersuchung wurden noch kleine Teile von Kolonien von Cyanophyceen aus den Versuchstöpfen auf sterilisierten Rasenboden in Petrischalen geimpft. Der Rasenboden entstammte der gleichen Stelle wie der der Versuchstöpfe. Diesem Boden wurde in verschiedener Menge

Kaliumchlorid oder Calciumphosphat zugesetzt. Die Versuche sind noch im Gange. Schon jetzt zeigt sich jedoch, daß sich *Nostoc* und *Cylindrospermum* in den Petrischalen, bei denen kein Kaliumchlorid und Calciumphosphat zugesetzt war, nicht schlechter entwickeln als dort, wo diese Salze zugegeben wurden. Hieraus könnte man folgern, daß erst dann die Nährsalze in den verwendeten Böden in so geringer Menge vorliegen, daß

25—50%, 2 = 5—25% der Untersuchungsfläche bedeckend, 1 = reichlich, aber weniger n, Deckungswert äußerst gering.

Lolium + Festuca				Lolium + Trifolium						Festuca + Trifolium						Festuca + Lolium + Trifolium					
N2	PK	N1 PK	N2 PK	—	N1	N2	PK	N1 PK	N2 PK	—	N1	N2	PK	N1 PK	N2 PK	—	N1	N2	PK	N1 PK	N2 PK
.	2	2	1	.	r	.	2	1	r	1	+	+	3	r	r	1	.	.	1	2	+
.	1	2	+	r	.	.	1	1	.	1	.	.	2	2	2	+	.	.	+	.	.
+	+	+	+	+	+	1	1	+	+	+	+	+	1	+	+	r	r	r	+	+	+
.	+	r	r	r	.	+	+	+	.	r	.	.	+	.	+	r	.	.	.	r	.
.	+	+	+	.	.	.	+	+	r	+	.	.	+	.	.	+	.	r	+	+	.
.	r	r	+	.	.	r	+	r	r	r	.	.	r	+	+	r	+	.	.	r	r
.	r	.	.	r	r	r	r	r	r	+	.	+	r	.	+	+	.	+	.	+	r
.	.	.	r	.	.	.	r	.	+	.	.	.	+	+	+	+	.	.	r	+	r
.	.	r	+	+	r	+	.	.	r

sich die vorgefundenen Cyanophyceen nicht mehr gut entwickeln können, wenn sie dem Boden zu einem großen Teil durch gleichzeitig dort wachsende Blütenpflanzen entzogen werden. Ist jedoch die Konkurrenz durch Gramineen und *Trifolium repens* ausgeschaltet, reicht die dem Boden eigene Nährsalzkonzentration für eine günstige Entwicklung der Blaualgen aus. Allerdings wurde die Entwicklung der Cyanophyceen in den Petrischalen auch durch noch gleichmäßigere Durchfeuchtung der Bodenoberfläche und vielleicht auch durch die stärkere Beleuchtung begünstigt.

Die Versuchsreihen scheinen daher geeignet zu sein, zu zeigen, daß die optimale Ausbreitungsfähigkeit einiger erdbewohnender Nostocaceen in starkem Maße von der Konkurrenz gleichzeitig mit ihnen am gleichen Orte wachsender Pflanzen abhängig ist. Es handelt sich hierbei offenbar nicht um eine Raum-, sondern um eine Nährstoff-Konkurrenz. Bei den hier angewandten Böden und Versuchsbedingungen sind die Cyanophyceen *Nostoc sphaericum* und *Cylindrospermum licheniforme*

a) *unbeschränkt ausbreitungsfähig* bei Ausschaltung jeder Konkurrenz durch höhere Pflanzen,

b) *nur unter Zusatz von Kaliumchlorid und Calciumphosphat optimal ausbreitungsfähig* bei Anwesenheit von Klee- und Grasbeständen, die aus 1—2 Arten zusammengesetzt sind,

c) *überhaupt nicht optimal ausbreitungsfähig* bei gleichzeitigem Aufwachsen einer vielseitiger zusammengesetzten Rasengesellschaft (in unserer Versuchsreihe 3 Arten).

Zusammenfassung.

1. In Versuchsgefäßen, die mit *Lolium perenne*, *Festuca rubra* oder *Trifolium repens*, bzw. mit Kombinationen dieser Arten besät waren, wurde ein sehr starkes Auftreten von Cyanophyceen fast stets beobachtet, wenn diese mit Calciumphosphat und zugleich mit Kaliumchlorid behandelt wurden.

2. Verstärkte Entwicklung der Cyanophyceen trat dagegen nicht in Erscheinung, wenn gleichzeitig alle 3 genannten Angiospermen-Arten in den Töpfen heranwuchsen. Vermutlich ist dann die Ausnutzung der Nährstoffe durch die Klee-Gras-Gesellschaft so intensiv, daß die Cyanophyceen nicht den für ihr Gedeihen notwendigen Überschuß vorfinden.

3. Eine Analyse der Mikroflora der Bodenoberfläche in den Versuchsgefäßen ergab 9 Cyanophyceen- und 26 Diatomeen-Arten. Starke Massenausbreitung zeigten im wesentlichen jedoch nur *Nostoc sphaericum* und *Cylindrospermum licheniforme*. Das allgemeine Auftreten dieser beiden Algen in geringen, makroskopisch nicht erfaßbaren Mengen zeigt, daß von ihnen Thalli und Vermehrungsorgane auf alle Versuchsgefäße gelangen konnten.

4. Bei Ausschaltung der Konkurrenz von Gräsern und Klee-Arten in einer weiteren Versuchsserie zeigte sich keine Begünstigung der Ausbreitung dieser Cyanophyceen auf den mit Kaliumchlorid und Calciumphosphat behandelten Schalen. Die Ausbreitung ist überall gleichmäßig günstig. Hier genügt also offenbar bereits die dem Boden eigene Nährsalzkonzentration zum optimalen Gedeihen der beiden Nostocaceen.

5. Die Ausbreitungsmöglichkeit von *Nostoc sphaericum* und *Cylindrospermum licheniforme* ist unter den angewandten Versuchsbedingungen

also in sehr starkem Maße von der Konkurrenz anderer Arten abhängig, die gleichzeitig in denselben Versuchsgefäßen wachsen.

Literatur.

- ALLEN, M. B.: Arch. f. Mikrobiol. **17**, 34 (1952). — BEIJERINCK, M. W.: Zbl. Bakter. II. Abt. **7**, 561 (1901). — BORESCH, K.: Jb. Bot. **52**, 145 (1913). — BRAUN-BLANQUET, J.: Pflanzensoziologie. Biol. Stud.-Bücher VII. Jena 1928. — DE, P. K.: Proc. Roy. Soc. Lond. Ser. B. **127**, 121 (1939). — ESMARCH, K.: Hedwigia (Dresden) **55**, 224 (1914). — GEITLER, L.: Cyanophyceae. Die Süßwasserflora Deutschlands, Österreichs und der Schweiz. H. 12. Jena 1912; Arch. Protistenkde. **62**, 96 (1928); Cyanophyceae. Rabenhorsts Kryptogamenflora. **14**. Leipzig 1932; Schizophyceae. Natürl. Pflanzenfamilien. 1b. 2. Aufl. Leipzig 1942. — GLADE, R.: Beitr. Biol. Pflanz. **12**, 295 (1913). — HARDER, R.: Z. Bot. **9**, 145 (1917); **15**, 305 (1923). — HUSTEDT, F.: Bacillariophyta (Diatomeae). Die Süßwasser-Flora Mitteleuropas. H. 10. Jena 1930. — JAMIESON, T.: Rept. Agr. Research. Assoc. Aberdeen (1907). — KNAPP, R.: Einführung in die Pflanzensoziologie. 1—3. Stuttgart-Ludwigsburg 1948/49. — KOCH, A., und P. KOSSOWITSCH: Bot. Ztg. **51**, 321 (1893). — MAERTENS, H.: Beitr. Biol. Pflanz. **12**, 439 (1914). — PRANTL, K.: Hedwigia (Dresden) **28**, 135 (1889). — PRINGSHEIM, E. G.: Beitr. Biol. Pflanz. **12**, 49 (1913). — RICHTER, O.: Die Ernährung der Algen. Monogr. u. Abhandl. z. intern. Rev. d. ges. Hydrobiologie u. Hydrographie. **2** (1911). — SCHINDLER, B.: Z. Bot. **5**, 505 (1913). — WINTER, A. G.: Beitr. Biol. Pflanz. **23**, 295 (1935). — ZIMMERMANN, W.: Z. Bot. **20**, 1 (1928).

(Aus dem Zoologischen Institut München, Abteilung: Paul Buchner-Institut für Experimentelle Symbiosforschung.)

B-Vitamine und Aminosäuren als Wachstumsstimulanten bei *Paramaecium caudatum* (Ehrbg.)¹.

Von

GEORG KREITMAIER.

Mit 18 Textabbildungen.

(Eingegangen am 30. März 1952.)

Die experimentelle Symbiosforschung beschäftigt sich besonders seit den Untersuchungen von KOCH an *Sitodrepa panicea* (Literatur bei KOCH 1951) mit den Problemen des Wachstums und dessen Beeinflussung durch Mikroorganismen, Naturstoffe und synthetische Substanzen. Der wasserlösliche Vitamin B-Komplex fand wegen seines Reichtums an wachstumsanregenden Stoffen auch hier eingehende Betrachtung. Relativ wenig bekannt ist jedoch gerade die quantitative Wirkung seiner einzelnen Teilkomponenten sowie ihr Verhalten in Gegenwart bestimmter Aminosäuren.

Das Ziel der nachstehenden Untersuchungen ist, einmal bei Protozoen mit Hilfe eines Schnelltestes diese Fragen etwas zu klären. Nach einer Reihe von Vorversuchen wurde schließlich *Paramaecium caudatum* Ehrbg. als einigermaßen zuverlässiges und leicht zu handhabendes Testobjekt ausgewählt. Die Untersuchungsmethode selbst beschränkt sich auf die Beeinflussung der Vermehrungsrate durch verschiedene Wuchsstoffkonzentrate. Im Anschluß an bekannte Substanzen wurden noch einige natürliche tierische und pflanzliche Extrakte als Vergleichsmaterial untersucht.

I. Material und Methode.

1. Das Kulturmedium und die Zusatzstoffe.

Als Kulturflüssigkeit diente sterile 0,01%ige KNORSche Lösung mit Zusatz von FeCl_3 nach der bei BÉLAR (1928, S. 747) angegebenen Vorschrift. Ihr pH-Wert betrug 6,73, gemessen mit einem Ionometer nach LAUTENSCHLÄGER mit Chinhydron-elektrode. Ein Zusatz von Bakterien als Futter erfolgte nicht. Das von BÉLAR (S. 755) genannte *Bacterium fluorescens* bildet Bacteriofluorescein, dessen toxische Wirkung auf das Testobjekt den Verlauf der Untersuchungen gefährden kann (vgl. dazu Befund bei COLPODA, KIDDER und STUART, 1939). Für meinen Schnelltest genügte jene geringe Bakterienmenge, welche durch den Arbeitsgang selbst in die Kulturschalen (Uhrschälchen 4 cm Durchmesser) hineingeriet. Über die Behandlung dieser Glasgeräte vgl. BÉLAR (1928, S. 741).

¹ Gekürzte Dissertation der Naturwissenschaftl. Fakultät der Universität München 1950.

Obgleich Knopflösung hemmend auf das Bakterienwachstum wirkt (BÉLAR), wird durch Zusatz der Wuchsstoffe oft nachträglich eine unerwünschte Bakterienvermehrung erzielt. Die Beeinflussung der Versuchsobjekte durch dieses verstärkte Nahrungsangebot soll später noch einmal eingehender erörtert werden.

Der 0,01%igen KNOP-Lösung (Grundmedium) wurden bestimmte Wuchsstoffe in genau abgewogenen Mengen (10 bzw. 1 mg) beigelegt und durch Verdünnen im Verhältnis 1:9 die einzelnen Konzentrationsstufen hergestellt. Bei leichtlöslichen Substanzen dürften die Mengenangaben weitgehend mit der tatsächlichen Wuchsstoffmenge übereinstimmen, bei schwerlöslichen nur als Annäherungswerte zu betrachten sein. Zur Vermeidung unerwünschter Veränderungen sind diese Wuchsstofflösungen möglichst erst vor Gebrauch anzusetzen und im Dunkeln aufzubewahren.

Nachstehend eine Übersicht über die verwendeten Zusatzstoffe und ihre Herkunft:

Abkürzung:	Genaue Bezeichnung:	Herkunft:
B ₁	Aneurinhydrochlorid	Hoffmann-La Roche
B ₂	Beflavin	Hoffmann-La Roche
B ₆	Aderminhydrochlorid	Hoffmann-La Roche
Nsa.	Nicotinsäureamid	Hoffmann-La Roche
Fols.	Folsäure, synth.	Kali Chemie
Biot.	d-Biotin	Hoffmann-La Roche
B ₁₂	B ₁₂ -Lösung	Merck, Rahway, N. J. USA.
B ₁₂ in Kz.	B ₁₂ -Konzentrat	Uvocal, Hamburg
Pa.	pantothensaures Ca	Hoffmann-La Roche
Ab.	p-Aminobenzoessäure	Hoffmann-La Roche
Inos.	Reininosit	Hoffmann-La Roche
Chol.	Cholinchlorid	Merck
Arg.	Argininchlorid	unbekannt
Asp.	l-Asparagin	Schuchardt
Al.	β-Alanin	Pharmazell, Raubling
Cy.	l-Cysteinhydrochlorid	Schuchardt
Gs.	l-Glutaminsäure	Merck
Hi.	l-Histidinmonochlorhydrat	Hoffmann-La Roche
Gn.	Glutathion	Pharmazell, Raubling
Ca.	Casein	Merck

2. Der Arbeitsgang und die Testauswertung.

Die gegenwärtig üblichen Arbeitsmethoden zur Prüfung des Vitaminbedarfes und der Wirkung spezifischer Wuchsstoffe bei Protozoen sind bei HALL (1943) eingehend beschrieben. Ich habe bei meinem Schnelltest, der nur die unterschiedlichen Vermehrungsraten festlegen sollte, Einzelkulturen verwendet, um eine wesentlich genauere Kontrolle zu ermöglichen. Die Protozoen wurden dabei mit Hilfe einer feinen Pipette aus der Rohkultur entnommen, durch mehrmaliges Waschen in steriler KNOP-Lösung gereinigt und in diesem Grundmedium 2–3 Tage isoliert. Diese „Wartezeit“ hatte den Zweck, die verschiedenen physiologischen Zustände der Einzelindividuen etwas auszugleichen. Eine längere Ausdehnung dieser „Hungerkur“ sollte jedoch vermieden werden.

Hierauf wurden 10 gereinigte und bezifferte Uhrschälchen mit je 0,5 cm³ der entsprechenden Kulturflüssigkeit versehen und immer je ein Versuchstier beigelegt.

Gleichlaufend mit den verschiedenen Konzentrationsstufen in Zehnerreihen waren 10 Einzellkulturen ohne Wuchsstoffzusatz (Kontrolle) vorbereitet worden. Eine nachträgliche Kontrolle unter dem Binokular war zur Vermeidung von Übertragungsfehlern erforderlich. Die Aufbewahrung der mit Glasscheiben bedeckten Kulturgefäße geschah in einem Thermostaten bei Dunkelheit und der relativ niederen Temperatur von 20—23° C, welche sowohl die Vermehrung der Testobjekte als auch das Bakterienwachstum bei hochaktiven Wuchsstoffen in erträglichen Grenzen halten sollte. Durch tägliche Kontrolle und Auszählen der Individuen (Binokular) ließen sich die unterschiedlichen Vermehrungsraten feststellen. Die Versuchsdauer selbst wurde auf 4 Tage einschließlich Versuchsbeginn begrenzt.

II. Versuchsteil.

1. Einzelwirkung der B-Vitamine und Aminosäuren.

Bei den nachstehenden Untersuchungen wurden naturgemäß nur jene Teilfaktoren des B-Komplexes berücksichtigt, deren Existenz genügend gesichert erscheint, wie B₁, B₂ und B₆, Nicotinsäureamid, Folsäure, d-Biotin, p-Aminobenzoesäure, Pantothersäure, B₁₂ (rein und als Konzentrat) sowie die „Nebenvitamine“ Inosit und Cholin. Auch bei den Aminosäuren wurde eine Auswahl getroffen, die zum Teil durch die Materialknappheit der vergangenen Jahre bedingt war.

Das Verhalten der Testobjekte sowohl in KNOPScher Kontrollösung (KNOP 0,01%) als auch nach Zugabe verschieden großer Wuchsstoffmengen ist aus Abb. 1 bis 9 ersichtlich und im Text noch näher erläutert. Die Konzentrationsangaben sind auf der Abszisse abgetragen (Milligramm Wuchsstoff in 1 cm³ KNOP 0,01%); auf der Ordinate stehen die nach 72 Std erreichten Individuenzahlen. Die erzielten Werte in der Kontrollösung ohne Wuchsstoffzusatz sind durch einen waagerechten Strich mit der Bezeichnung „KNOP 0,01%“ gekennzeichnet.

So zeigt z. B. Abb. 1c die Abhängigkeit der Thiaminwirkung von der Konzentration des Wuchsstoffes im Kulturmedium. Dabei konnten alle von mir benützten Dosen B₁ (0,1—100 γ /cm³) zunächst eine erhöhte Wirkung gegenüber der Kontrolle aufweisen. Nach 48 Std änderte sich dieses Verhältnis grundlegend. Während sich in 0,1 und 1 γ /cm³ auch weiterhin ein stetiges Ansteigen der Individuenzahl zeigte, trat bei 10 und 100 γ /cm³ B₁ Hemmung ein. Diese Wachstumshemmung durch größere Thiaminmengen hat bereits SCHOPFER (1935, zit. nach RUDOLPH 1948) bei pflanzlichen Mikroorganismen beschrieben. Eine Erhöhung der Dosis auf 1000 γ /cm³ B₁ hatte in jedem Falle den Tod der Versuchstiere zur Folge. Die Zeitdauer bis zum Eintritt des Todes war individuell verschieden, sie schwankte zwischen einigen Sekunden bis zu mehreren Minuten.

Ein Parallelversuch bei höherer Temperatur (bis 26° C) ließ außerdem erkennen, daß auch die optimale B₁-Menge bei Temperaturerhöhung eine größere sein dürfte (1—10 γ /cm³ statt 0,1—1 γ /cm³ wie beim ersten Versuch). Auch dieser Befund scheint nicht ungewöhnlich zu sein, entspricht vielmehr unseren Kenntnissen über den Vitamin B₁-Bedarf im allgemeinen, welche u. a. besagen, daß eine vermehrte Intensität des Stoffwechsels infolge erhöhter Temperatur zugleich das Vitamin B₁-„Bedürfnis“ erhöht.

Auf eine recht unterschiedliche Wirkung der Maximaldosen B₁ und B₂ deuteten die Ergebnisse mit 10 bzw. 100 γ /cm³ B₂ hin (Abb. 2). 100 γ /cm³

waren in jedem Falle letal, $10 \gamma/\text{cm}^3$ B_2 bereits so stark wachstumshemmend, daß gegenüber der Kontrolle ohne Wuchsstoffzusatz überhaupt

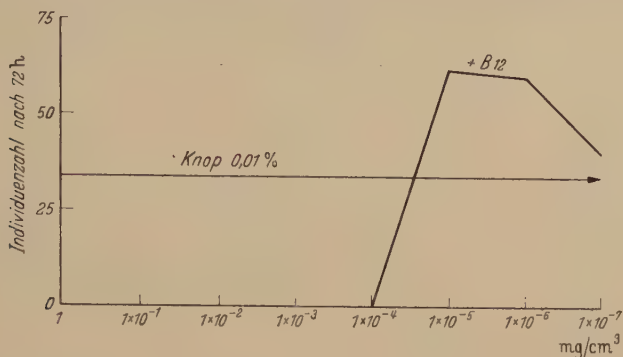


Abb. 1a.

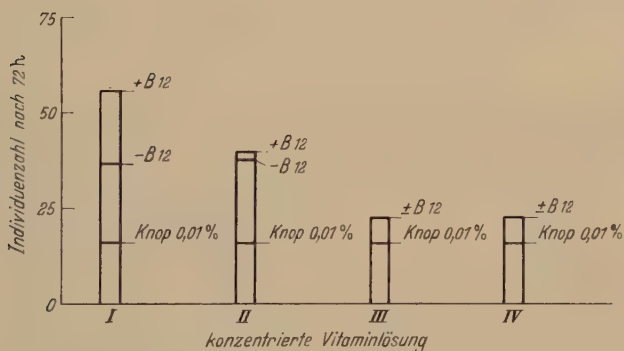


Abb. 1b.

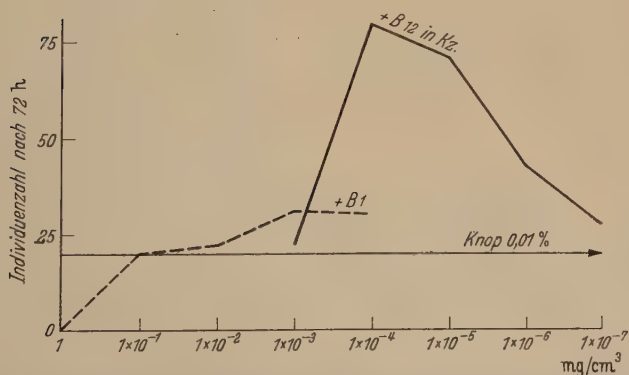


Abb. 1c.

Abb. 1. Individuenzahl von *Paramaecium caudatum* nach 72 Std unter der Wirkung der Zugabe verschiedener Konzentrationen von Vitaminen zur Nährlösung. Die horizontale Linie „Knop 0,01%“ stellt hier wie in den folgenden Abbildungen die Individuenzahl ohne Zusatz des Wirkstoffes dar. a) Vitamin B_{12} ; b) B-Vitamine mit und ohne Vitamin B_{12} . Konzentrationsstufe I enthielt in 1 cm^3 KNOPscher Lösung: $0,4 \gamma B_1$, $0,4 \gamma B_2$, $1,2 \gamma$ Nicotinsäureamid, $2,4 \gamma B_6$, $0,08 \gamma$ Pantothensäure, $0,0008 \gamma$ Biotin, $0,02 \gamma B_{12}$; Konzentrationsstufe II $1/2$ davon, die Stufen III und IV jeweils wiederum $1/2$ der Bestandteile der vorhergehenden Stufe; c) Vitamin B_1 und Vitamin B_{12} als Konzentrat.

kein Unterschied zu bemerken war. Eine Überdosierung dürfte also gerade bei B_2 recht nachteilig sein. Auch KOCH (1951) weist bei seinem ganz anderen Testobjekt *Tribolium confusum* Duv. auf die Gefahren einer B_2 -Überdosierung hin. Weniger gefährlich scheint eine Überdosierung bei B_6 zu sein (Abb. 2). Wenn auch hier $100 \gamma/\text{cm}^3$ letal waren

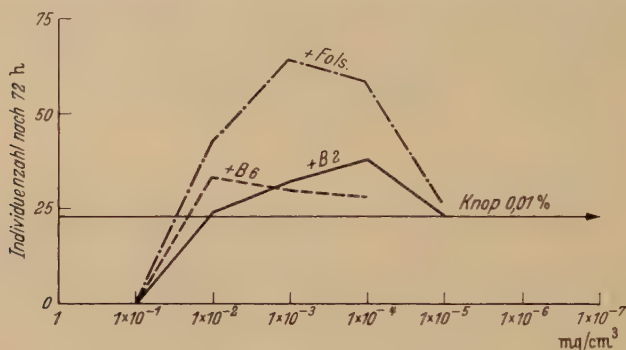


Abb. 2. Vitamin B_2 , Vitamin B_6 und Folsäure.

so zeigten doch $10 \gamma/\text{cm}^3$ B_6 eine viel günstigere, in diesem Falle sogar optimale Wirkung. Von Wichtigkeit dürfte ferner sein, daß die Minimal-

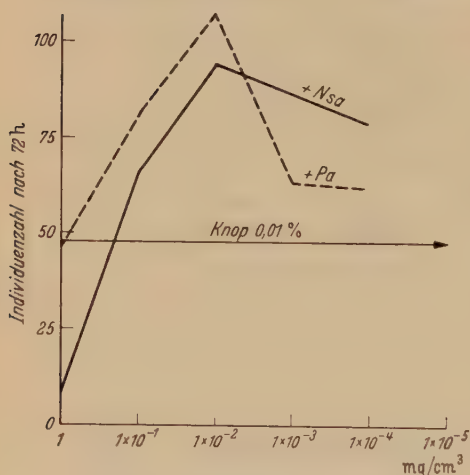


Abb. 3. Pantothensaures Calcium und Nicotinsäureamid.

dosis ($0,1 \gamma/\text{cm}^3$ B_6) in den ersten 48 Versuchsstunden eine größere Vermehrungsziffer erzielte als alle höheren Dosen, die aber in den nächsten 24 Std dafür diesen Vorsprung wieder einholten.

Soweit über das Verhalten der Protozoen in Gegenwart von Nicotinsäure etwas bekannt ist, teilen sich hier die Ansichten. Besonders LILLY machte mit Nicotinsäure bei *Stylonychia pustulata* keine guten Erfahrungen, während HALL mit B_1 , B_2 und Nicotinsäure Erfolge aufzuweisen hatte (vgl. HALL 1943, dort weitere Literatur). Meines Erachtens dürfte die Acidität der freien Säure für LILLYS Mißerfolg

ausschlaggebend gewesen sein, ließ sich doch das Amid bei *Paramaecium* noch in einer Konzentration von $100 \gamma/\text{cm}^3$ (Abb. 3) verwenden. Kleinere Mengen des Amides beeinflussten die Vermehrung der Testobjekte freilich günstiger. Auch pantothensaures Ca (Abb. 3) war in höherer Konzentration noch verträglicher als B_1 , B_2 und B_6 . Selbst die relativ sehr hohe

Dosis $1000 \gamma/\text{cm}^3$ war noch nicht letal. Diese Überkonzentration an pantothen-saurem Ca wirkte selbstverständlich nicht mehr vermehrungs-fördernd, Teilung der Testobjekte wurde in all diesen Fällen während der ganzen Versuchsdauer nicht mehr beobachtet.

Folsäure (Abb. 2) und p-Aminobenzoesäure (Abb. 8) mußten bei *Paramaecium* dagegen schon wieder niedriger dosiert werden. $0,1$ und $1 \gamma/\text{cm}^3$ Fols. wirkten sehr günstig und auch $0,01 \gamma/\text{cm}^3$ Fols. ergab noch eine kleine Vermehrungssteigerung, die allerdings erst nach 48 Std ein-trat. Diese Tendenz zu niedrigeren Dosen machte sich auch bei p-Amino-benzoesäure unliebsam bemerkbar, das Wirkungsoptimum dürfte hier erst bei etwa $0,1 \gamma/\text{cm}^3$ zu suchen sein.

Von allen bisherigen Wuchsstoffen abweichend verhielten sich endlich d-Biotin und das Vitamin B_{12} , das in gelöster Form zur Untersuchung vorlag (vgl. Abb. 1a mit Abb. 5). Schon ein Zusatz von $1 \gamma/\text{cm}^3$ Biotin

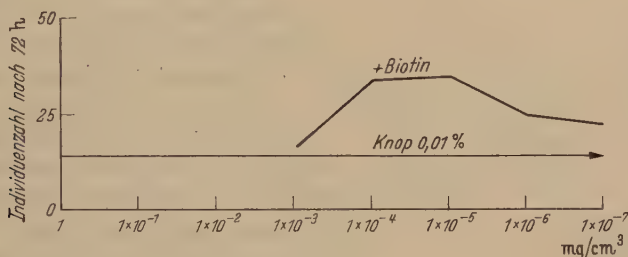


Abb. 5. d-Biotin.

bewirkte nach ursprünglicher Beschleunigung eine deutliche Wachstums-hemmung. Das Optimum dürfte hier sogar noch niedriger als bei der p-Aminobenzoesäure liegen (etwa $0,01 \gamma/\text{cm}^3$). Selbst Konzentrationen von $0,001$ und $0,0001 \gamma/\text{cm}^3$ wiesen noch erkennenswerte Unterschiede gegenüber der Kontrolle ohne Wuchsstoffzusatz auf. Vergleicht man diese Ergebnisse mit denen bei anderen Objekten, z. B. Hefen (nach RUDOLPH, 1948, sind $0,2 \gamma/\text{Liter}$ Nährlösung optimal), so finden wir auch hier übereinstimmend die Tendenz zur „Spurenwirksamkeit“. Das End-glied dieser Reihe bildet das Vitamin B_{12} , das bereits in einer Konzen-tration von $0,1 \gamma/\text{cm}^3$ Nährlösung toxisch wirkte und sein Optimum erst bei $0,01$ — $0,001 \gamma/\text{cm}^3$ aufwies. Auch ein B_{12} -Konzentrat der Uvocalwerke (Hamburg) steigerte die Teilungsgeschwindigkeit der Testobjekte ganz wesentlich (Abb. 1c). Doch war hier eine Konzentration von $0,1 \gamma B_{12}/\text{cm}^3$ noch nicht letal, wenn auch die Überdosierung wachstumshemmend wirkte. Allerdings mußte ich mich hier auf die Mengenangaben der Her-stellerfirma verlassen.

Abb. 1b zeigt dann schließlich noch das Verhalten der Testobjekte in Gegenwart aller bisher besprochenen B-Faktoren, jedoch abwechselnd

ohne und mit B_{12} . Die zusätzliche Wirkung des B_{12} war bei Konzentrationsstufe I mit $0,02 \gamma/\text{cm}^3$ B_{12} scheinbar so günstig, daß die Individuenzahl nach 72 Std noch wesentlich höher als im Vitaminmedium

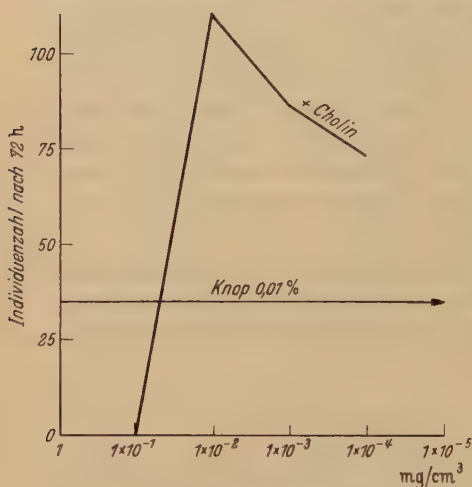


Abb. 4. Cholinchlorid.

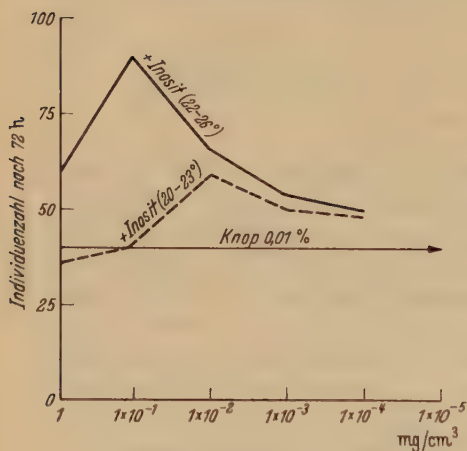


Abb. 6. Inosit.

ohne B_{12} war. Kleinere Zusätze waren dagegen nicht von nennenswerter Bedeutung.

Soviel die bisherigen Versuche erkennen ließen, dürften auch die „Nebenvitamine“ Inosit und Cholin als wichtige Wachstumsstimulanten gelten (Abb. 4 und 6). Parallelversuche zeigten bei ersterem gleichfalls eine Verschiebung des Optimalbereiches zugunsten einer größeren Wuchsstoffmenge bei steigender Versuchstemperatur (vgl. dazu Bericht über B_1). Die Abhängigkeit der Wuchsstoffwirkung von anorganischen Stoffen wurde beim Inosit durch Ansetzen einer KNOP-Lösung ohne KH_2PO_4 nachgewiesen. Zugaben von 10 bzw. $1 \gamma/\text{cm}^3$ Reininosit waren völlig negativ, obwohl außer dem Phosphat-Ion alle vorher gebrauchten Stoffe anwesend waren. In diesem Zusammenhang sei auf die Untersuchungen von KIRKWOOD und PHILLIPS (1946, zit. nach RUDOLPH 1948) hingewiesen, die durch Substitution der OH-Gruppen des Inosits mit Chloratomen eine Umkehr der wachstumsfördernden Wirkung erzielten, die durch Inositgaben wieder beseitigt werden konnte. Alle diese Befunde deuten meines Erachtens

auf eine Esterbildung zwischen Inosit und Phosphorsäure im Körperstoffwechsel hin. Erst dieser Ester dürfte als der endgültige sekundäre Wuchsstoff angesehen werden.

Die Wuchsstoffwirkung der Aminosäuren ist abgesehen von weiteren Möglichkeiten wohl zum Teil mit dem N-Bedarf der Organismen verknüpft. Schon vor 20 Jahren hat LWOFF (1932) festgestellt, daß mit zunehmender morphologischer Entwicklung der Protozoen auch ihr

Anspruch an Nährstoffen zur Eiweißsynthese steigt. Es war deshalb von besonderem Interesse, Aminosäuren in den Bereich der Untersuchungen einzubeziehen und vorerst einmal ihr spezielles Verhalten bei *Paramaecium* zu testen. Die Abb. 7—9 zeigen, daß auch hier die Konzentration des Kulturmediums eine

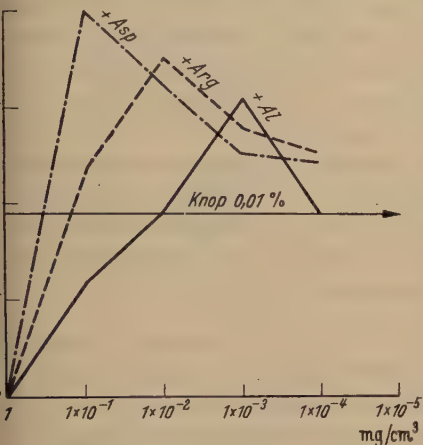


Abb. 7.
β-Alanin, Argininchlorid, l-Asparagin.

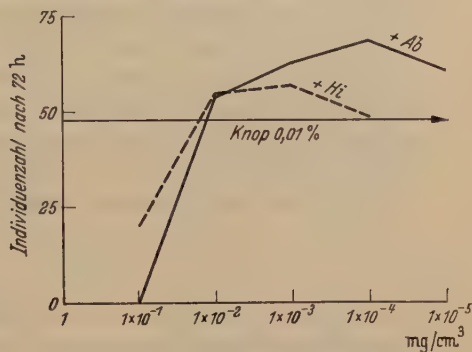


Abb. 8. p-Aminobenzoësäure, l-Histidin-monochlorhydrat.

große Rolle spielt. In guter Übereinstimmung mit späteren, in dieser Arbeit nicht mehr erwähnten Befunden, kann dabei angenommen werden, daß Säureamide für *Paramaecium* weniger toxisch wirken als die entsprechenden nichtsubstituierten Aminosäuren selbst. Sie können

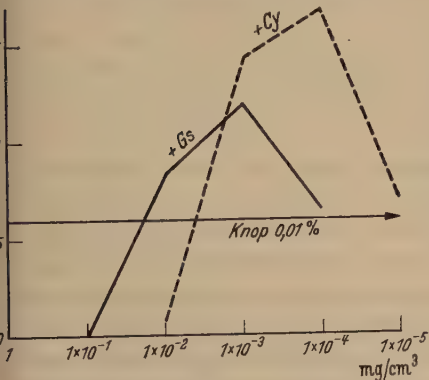


Abb. 9. l-Glutaminsäure, l-Cysteinhydrochlorid.

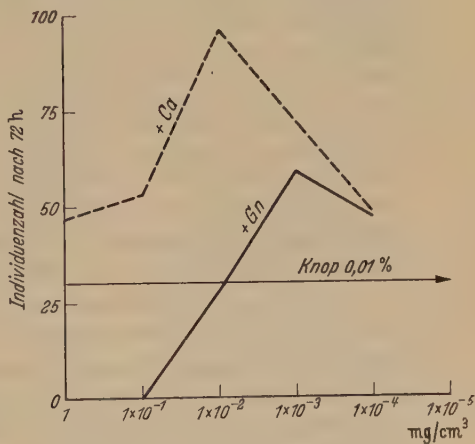


Abb. 10. Glutathion, Casein.

daher auch in höheren Dosen verabreicht werden (vgl. dazu Bericht über Glutaminsäure und Glutamin bei RUDOLPH, 1948).

Noch empfindlicher als auf unsubstituierte Aminosäuren reagierten die Versuchstiere auf Cystein, wahrscheinlich durch deren SH-Gruppe

bedingt. $10 \gamma/\text{cm}^3$ waren zumeist von toxischer Wirkung. Vielleicht könnte damit der Befund von GOULD (1944, zit. nach RUDOLPH 1948), demzufolge Glutathion anregend, sein Bestandteil Cystein hemmend auf das Bakterienwachstum wirken soll, eine Erklärung finden. Vergleicht man nämlich Abb. 10 mit Abb. 9, so erkennt man, daß die gleiche Menge Glutathion keineswegs toxisch wirkte. Das Tripeptid enthält ja neben Cystein auch noch Glykokoll und Glutaminsäure, die relative Menge des „gefährlichen“ Anteils ist also hier bedeutend geringer.

Im Gegensatz zum Cystein und den meisten der übrigen Aminosäuren stand schließlich noch ein zusammengesetzter Eiweißkörper, das Casein, welches noch in einer Dosis von etwa $1000 \gamma/\text{cm}^3$ geboten werden konnte (Abb. 10). Die weitgehende Unlöslichkeit dürfte hier wohl mit ein Grund für die große Verträglichkeit dieses Stoffes sein.

2. Der Einfluß der Aminosäuren auf die optimale Wuchsstoffwirkung der B-Vitamine.

Im Jahre 1935 gelang es erstmalig, nähere Einzelheiten über das Zusammenspiel von Vitaminen und Aminosäuren im Wachstum niederer Organismen festzustellen. Nachstehend soll dem Einfluß des Zusatzes verschiedener Aminosäuredosen auf die Veränderung der Optimalwirkung der Vitamine nachgegangen werden.

Ausgehend von einer annähernd optimal befundenen Vitaminmenge wurden 3 Konzentrationsstufen (10 , 1 und $0,1 \gamma/\text{cm}^3$) von 6 verschiedenen Aminosäuren zugesetzt und die Wirkung dieser Wuchsstoffkombinationen mit der des Vitamins und der Knorschen Lösung verglichen. In gleicher Weise war auch das B_{12} -Konzentrat (reines B_{12} stand damals noch nicht zur Verfügung), das Tripeptid Glutathion und das Phosphorprotein Casein zur Untersuchung einbezogen worden. Außerdem wurden probeweise 2 Vertreter der B-Vitamine, die Pantothenensäure und die p-Aminobenzoesäure, an Stelle der Aminosäuren verwendet; die Pantothenensäure deshalb, weil sie als Dipeptid angesehen werden kann, die p-Aminobenzoesäure darum, weil ihr Verhalten im Konzentrationsgefälle gegenüber anderen B-Vitaminen interessierte.

Die Abb. 11—13 zeigen die Ergebnisse, welche im Versuche mit der jeweils günstigsten der 3 geprüften Zusatzkonzentrationen von 10 , 1 und $0,1 \gamma/\text{cm}^3$ der zu prüfenden Stoffe erzielt wurden. In den Diagrammen der Abb. 11, 12 und 13 sind keine Konzentrationsangaben der Aminosäuren gemacht; sie sollen weiter unten erläutert werden. Jedem Vitamin entspricht dabei eine Säule, auf der der Länge nach die Vermehrungsrate von 10 Tieren in 72 Std bei Zugabe der Aminosäuren eingetragen ist. Die Bezeichnung der Zusatzwuchsstoffe ist abgekürzt worden (Erläuterung hierzu S. 301). Schwankungen der Kontrollwerte ($K_{\text{NOP}} 0,01\%$, ohne Wuchsstoffzusatz) sind durch schwarze Felder gekennzeichnet.

Die besten Ergebnisse mit mittlerer und kleiner Aminosäuredosis (1 bzw. $0,1 \gamma/\text{cm}^3$) brachten ohne Zweifel Arginin und Alanin. Asparagin, Histidin, Glutaminsäure dagegen waren mit einer Zusatzdosis von

$10 \gamma/\text{cm}^3$ in der Regel wirkungsvoller. Entsprechend der Einzelwirkung des Cysteins verursachten $10 \gamma/\text{cm}^3$ dieser Aminosäure auch in Gegenwart eines Vitamins den Tod der Versuchstiere. Auch bei kleineren Cysteinuzusätzen waren die Erfolge meist sehr gering, teilweise trat sogar eine Verschlechterung der ursprünglichen Wirkung ein. Letzteres wurde übrigens auch im Folsäure- und Cholinmedium nach Glutathionzusatz festgestellt.

Das Verhalten der p-Aminobenzoesäure im Konzentrationsgefälle gegenüber den anderen Vitaminen deutete darauf hin, daß hier ebenfalls, wie bei der Einzelwirkung, nur geringe Mengen für das Testobjekt erträglich zu sein scheinen. Dosen mit $10 \gamma/\text{cm}^3$ erwiesen sich in allen Vitaminlösungen, ausgenommen B_2 , als wachstumshemmend. Folsäure- und biotinhaltige Medien reagierten überhaupt kaum auf Zusätze von p-Aminobenzoesäure, das Cholinmedium ausgesprochen negativ.

Aus den Vermehrungsziffern im Vitaminmedium mit den 6 untersuchten Aminosäuren ergibt sich, daß Asparagin und Arginin gehäuft an erster, bzw. zweiter Stelle stehen. Nur bei Nicotinsäureamid beginnt die Reihe mit der unsubstituierten Glutaminsäure; hier steht, von Cystein abgesehen, Asparagin an vorletzter, Arginin an letzter Stelle. Es ist nahelegend, die günstigsten Fälle mit dem „Amino-carboxyl-Verhältnis“ des

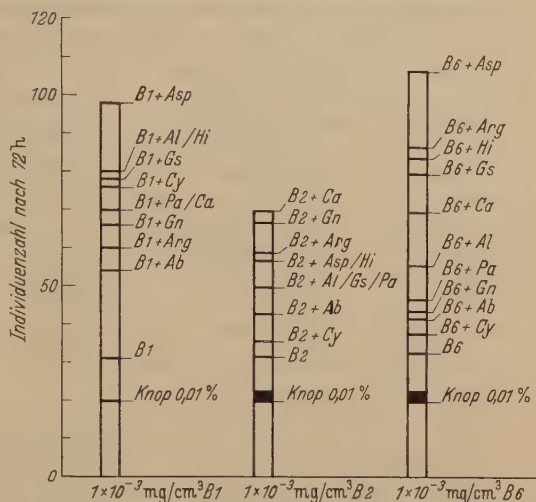


Abb. 11. Zusammenwirken von Vitaminen (B_1 , B_2 und B_6) und Aminosäuren.

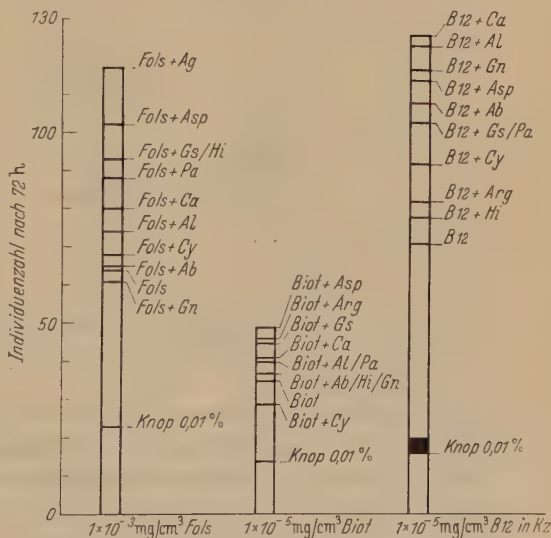


Abb. 12. Zusammenwirken von Folsäure, d-Biotin, Vitamin B_{12} (als Konzentrat) mit Aminosäuren.

Kulturmediums in Verbindung zu bringen, das, von weiteren Möglichkeiten abgesehen, doch wiederum die Acidität, bzw. Alkalität des Kulturmediums zu regulieren vermag. Auch das von RUDOLPH (1948) mehrmals genannte NH_4 -Ion dürfte in dieser Richtung wirksam sein.

Die hier nur in wenigen Versuchen gemachten Beobachtungen lassen natürlich vorerst noch keine Verallgemeinerung zu. Sie gewinnen jedoch an Wert, wenn wir z. B. die Befunde von KRAUT (siehe LEHNARTZ 1947, S. 276, Tab. 45) bei Proteasen heranziehen. Ließ sich doch auch bei letz-

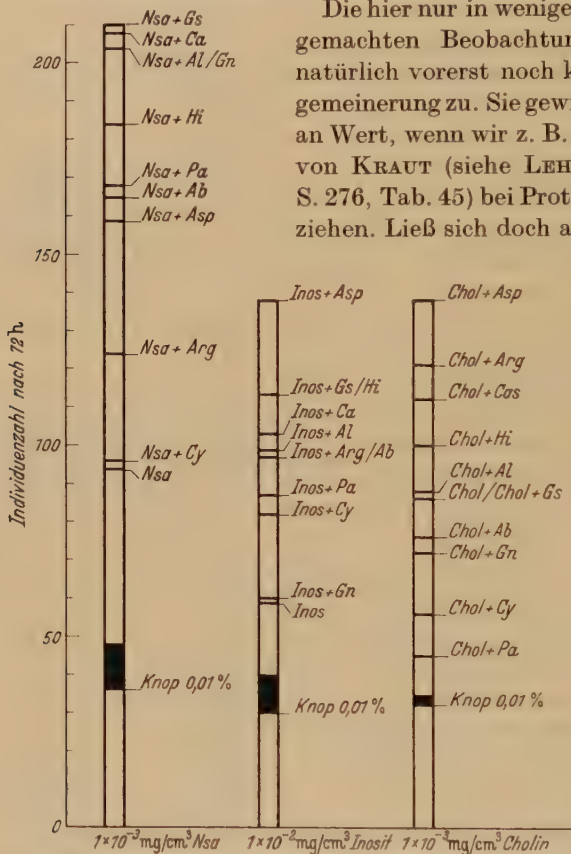


Abb. 13. Zusammenwirken von Nicotinsäureamid, Inosit, Cholin mit Aminosäuren.

teren eine deutliche Abhängigkeit der Fermentwirkung von NH_2 - bzw. COOH -Gruppen feststellen. Untersuchungen auf wesentlich breiterer Basis könnten die biologischen Zusammenhänge der B-Vitamine und Aminosäuren wohl noch eindeutiger klären.

3. Natürliche Wirkstoffextrakte und unbekannte Wachstumsstoffe.

Von amerikanischen Autoren sind in den letzten Jahrzehnten mehrmals unbekannte und scheinbar lebensnotwendige Faktoren für das Wachstum der Protozoen, besonders bei parasitischen Flagellaten, wie *Trypanosoma*-, *Leishmania*-, *Eutrichomastix*- und *Trichomonas*-Arten

beschrieben worden. Einzelheiten und Literaturangaben hierüber bringt HALL (1943), der allerdings auch dazu bemerkt, daß nicht alle Berichte vollkommen einwandfrei sein dürften.

Meine eigenen Versuche sollten nun keineswegs zur Auffindung neuer Wachstumsstoffe dienen, sondern nur einen Vergleich der vermehrungsfördernden Wirkung der vorstehend verwendeten Substanzen mit natürlichen Extrakten aus Hefen, Schimmelpilzen und tierischen Organen ermöglichen. Die hierzu verwendeten Rohstoffe wurden mit 50% Alkohol im Soxhlet extrahiert und auf ein bestimmtes Volumen eingeeengt. Da jeweils immer dieselbe Gewichtsmenge mit einer bestimmten gleichen Menge des Lösungsmittels behandelt wurde, waren sämtliche Extrakte untereinander vergleichbar. Einzelheiten hierüber seien der Arbeit J. REITINGERS vorbehalten. Eine Konzentrationsabstufung wurde in der Regel nicht durchgeführt. Die flüssigen Extrakte (jeweils 0,05 cm³) wurden mit 10 cm³ KNOP-Lösung verdünnt (1 Teil Extrakt auf 200 Teile KNOP-Lösung).

Die in Abb. 14 dargestellte Wirkung von Extrakten der Holzzuckerhefe *Torulopsis utilis* zeigte eine eindeutige Abhängigkeit vom Alter des Präparates. Während ein frischer Rohextrakt sechsfache Vermehrungssteigerung gegenüber der Kontrolle (Knop 0,01%) ergab, konnte nach dreiwöchiger Lagerung des Präparates nur noch eine dreifache Vermehrungssteigerung festgestellt werden. Es ergab sich somit durch Alterung des Präparates, zum Teil vielleicht auch durch Lichteinwirkung bedingt, ein Wirkungsverlust von durchschnittlich 50%. Diese Feststellung dürfte für die Beurteilung des aus *Torulopsis utilis* dargestellten sogenannten „Vitamin T“ (Originalpräparat von Herrn Prof. W. GOETSCH) von Bedeutung sein, das zur Zeit des Versuches etwa 4 Wochen gelagert war.

Genauere Untersuchungen über die Ursachen dieser „Alterserscheinungen“ von Hefe-Extrakten wurden nicht angestellt. Es ist nicht ausgeschlossen, daß die Wirkungsminderung auf eine Luftinfektion zurückzuführen war.

Abb. 14 läßt weiterhin die Wirkung frischer Rohextrakte aus Bierhefe, Gerstenkeimlingen, zwei Pilzen, sowie aus Herz, Leber und Niere verschiedener Tiere erkennen. Die ersten beiden Extrakte übertrafen in ihrer Wirksamkeit den aus *Torulopsis* noch bei weitem und dürften vielleicht mit zu den besten natürlichen Wirkstoffkombinationen zählen. Auch die übrigen Organ- und Pilzrohextrakte erreichten diese außergewöhnlichen Vermehrungsziffern in keiner Weise. Erwähnt sei jedoch noch das Verhalten zweier Rohextrakte (Leber von *Esox lucius*, Herz von *Bos taurus*) und deren Innen- und Außendialysate. Während die Innendialysate die Versuchstiere in nahezu gleicher Weise beeinflussten, waren die Rohextrakte und deren Außendialysate von recht unterschiedlicher Wirkung. Wir dürfen also keineswegs annehmen, daß alle Substanzen, welche die Natur in ihren Rohstoffen vereinigt, genau so harmonisieren müssen wie bei Bierhefe und Gerstenkeimen. Die Dialyse vermag deshalb unter Umständen eine wesentliche Steigerung der Wachstumsstoffaktivität herbeizuführen. Diese Erfahrungen mahnen zur Vorsicht vor Verallgemeinerungen; man wird in jedem Einzelfall nachprüfen müssen, unter welchen

Bedingungen eine Steigerung der vorhandenen Wirkstoffaktivität zu erzielen ist.

III. Diskussion der Versuchsergebnisse und weitere Versuche.

1. Bakterienwachstum und Individuenzahl.

Durch den Wirkstoffzusatz wird selbstverständlich auch das Bakterienwachstum des Kulturmediums stark angeregt. Da *Paramaecium cau-*

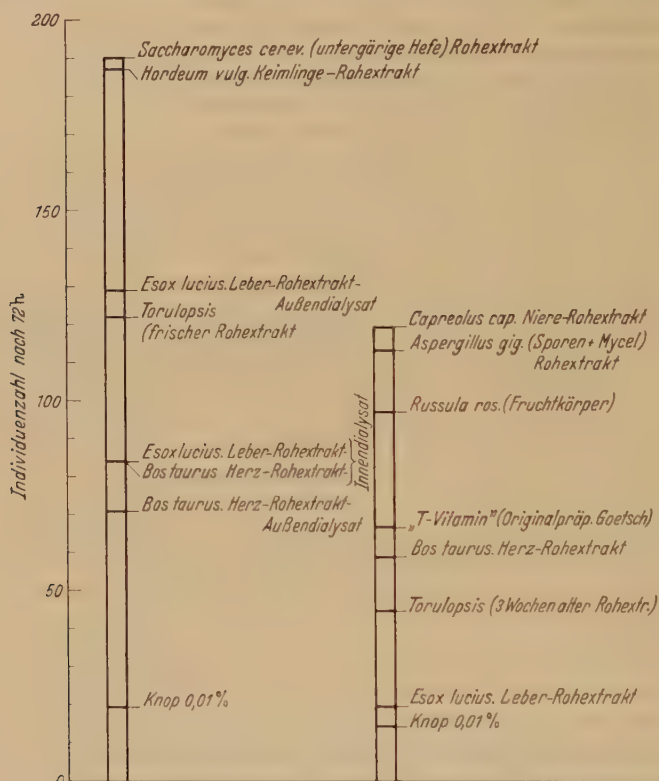


Abb. 14. Wirkung von Extrakten verschiedener natürlicher Herkunft. Konzentration: 1 Teil Extrakt auf 200 Teile KNOP-Lösung 0,01%.

datum ein ausgesprochener Bakterienfresser ist, könnte die beobachtete Erhöhung der Teilungsrate allein schon durch das reichlichere Futterangebot zu erklären sein. Aber es wäre auch möglich, daß daneben noch eine unmittelbare Beeinflussung durch das Wirkstoffangebot selbst in Betracht zu ziehen ist. Daß diese Frage nicht leicht zu beantworten ist, zeigen die Versuche mit p-Aminobenzoesäure. Hier bevorzugten die *Paramaecien* offensichtlich geringere, die Bakterien dagegen höhere Wuchsstoffdosen. Folgen wir den Ausführungen RICHARDS (1941, dort weitere

Literatur), dann werden die Verhältnisse noch komplizierter. Dieser berichtet nämlich von Versuchen, bei denen auch das Verhältnis „Bakterien : Protozoen“ als wachstumsbeeinflussend befunden wurde.

Um das Abhängigkeitsverhältnis der Individuenzahl von Bakterien und deren Stoffwechselprodukten in einem Versuche noch eingehender nachzuprüfen, wurden 3 verschiedene Lösungen jeweils gleicher Wuchsstoffkonzentration (Nicotinsäureamid 1, 10, 100 und 1000 γ/cm^3) getestet. Lösung 1 wurde frisch zubereitet, Lösung 3 war 5 Tage vorher hergestellt und nach Luftinfektion im Thermostaten bei 28° C gehalten worden. Die durch Bakterien verursachte Trübung wurde bei Versuchsbeginn im LANGESchen Colorimeter gemessen; sie betrug bei 1000 γ/cm^3 Nicotinsäureamid 26 mV, bei 100 γ/cm^3 3 mV, bei 10 und 1 γ/cm^3 0 mV. Ein Teil der Lösung 3 wurde mit Hilfe eines Bakterienfilters bakterienfrei gemacht, so daß sie nur Bakterienstoffwechselprodukte enthalten konnte (Lösung 2). Damit waren also für jede der Wuchsstoffkonzentrationen 3 verschiedene Bedingungen vorhanden:

1. eine bakterienfreie frische Lösung, 2. eine bakterienfreie Lösung mit den entsprechenden Bakterienstoffwechselprodukten, 3. eine durch Bakterien bereits verunreinigte Lösung.

Die Lösungen 1, 2 und 3 wurden in üblicher Weise getestet (Abb. 15). Durch das Einsetzen der Tiere bei Versuchsbeginn erfuhren natürlich alle Lösungen eine geringe Verunreinigung mit Bakterien, die sich während der Versuchsdauer vermehrten; der Grad der Vermehrung war jedoch auf Grund der Vorbehandlung der Kulturlösungen verschieden.

Bei einer Konzentration von 1 γ/cm^3 Nicotinsäureamid war noch kein Vermehrungsunterschied der Tiere zwischen frischer Lösung (1) und solcher mit nur geringfügigen Bakterienstoffwechselprodukten (2) zu erkennen. Die in Lösung 3 bereits bei Versuchsbeginn vermehrt vorhandene Bakterienanzahl genügte dagegen schon, um eine etwas stärkere Zunahme an Individuen zu bewirken. Bei 10 γ/cm^3 war die Anzahl der *Paramaecien* in allen 3 Lösungen erhöht; ganz besonders stark war das bei Lösung 2 der Fall, die neben den üblichen Substanzen bei Versuchsbeginn vorwiegend bakterielle Stoffwechselprodukte enthielt. Die Konzentration letzterer dürfte etwa 10 mal so groß wie jene der 1 γ -Dosis gewesen sein. Diese günstige Wirkung auf die Vermehrung der Versuchstiere läßt vermuten, daß auch Bakterienstoffwechselprodukte in geeigneter Konzentration wachstumsanregend wirken. Widersprechend ist allerdings, daß bei Anwesenheit der entsprechenden Bakterienmenge selbst eine ähnliche Vermehrung der *Paramaecien* nicht zu beobachten war. Bei 100 γ/cm^3 Nicotinsäureamid zeigt Lösung 2 gegenüber der entsprechenden bei 10 γ/cm^3 Nicotinsäureamid etwas verminderte Wirkung, das Wachstum war aber immer noch bedeutend stärker als in frischer Wuchsstofflösung. Lösung 2 und 3 wiesen gleiche Individuenzahl auf. Nach ursprünglich stärkerer Vermehrung trat bei dieser relativ hohen Wuchsstoffdosis nach 48 Std eine geringe Wachstumshemmung zutage. Eine Maximaldosis von 1000 γ/cm^3 Nicotinsäureamid verursachte schließlich sowohl in Lösung 2 als auch 3 den Tod der Versuchstiere. In frisch zubereiteter Lösung gleicher Konzentration konnte dies zwar nicht beobachtet werden, doch

war das Wachstum hier noch geringer als bei der schwächsten Nicotinsäureamiddosis. Auch bei den früheren Versuchen mit Nicotinsäureamid war bei den höheren Konzentrationen vermehrte Neigung zu Wachstumshemmung und Toxizität zu bemerken.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß erhöhte *Paramaecien*-Zahlen nicht allein durch eine vermehrte Bakterienanzahl ausgelöst werden. Gesteigertes „Futterangebot“ bei Versuchsbeginn erlaubt gewöhnlich nur einen „besseren Start“ für die Versuchsobjekte, deren Vorsprung innerhalb der kurzen Versuchsdauer aufrechterhalten bleibt. Letzten

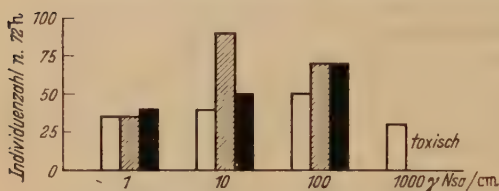


Abb. 15. Wirkung von frischer Lösung (weiße Säulen), Lösung mit Stoffwechselprodukten von Bakterien (gestrichelte Säulen) und mit Bakterien verunreinigter Lösung (schwarze Säulen) bei verschiedener Konzentration von Nicotinsäureamid.

Endes ist es aber auch die Konzentration der Wuchsstofflösung sowie die Konzentration der Bakterienstoffwechselprodukte, wahrscheinlich auch das Kräfteverhältnis (Anzahl der vorhandenen Lebewesen) zwischen Bakterien und *Paramaecien*, welche den Wachstumserfolg daneben bestimmen.

2. Wuchsstoffwirkung und Wuchsstoffkonzentration.

Wie alle hier beschriebenen Versuche gezeigt haben, war eine Wachstumsanregung des Testobjektes jeweils immer von bestimmten Wuchsstoffmengen im Kulturmedium abhängig. Dieser Wirkungsbereich der einzelnen Wuchsstoffe war, soweit im Versuche geprüft, bei einer Reihe von Substanzen annähernd gleich, andere wiederum erforderten jedoch abweichende Konzentrationen. Erhöhungen der Wuchsstoffdosis über ihren spezifischen Wirkungsbereich hinaus verursachten Wachstumshemmung, im extremen Falle sogar toxischen Effekt. Um diese einzelnen Verhältnisse miteinander vergleichen zu können, sollen die untersuchten Wuchsstoffe noch einmal gegenübergestellt werden (Abb. 16).

Das aus Abb. 16 ersichtliche Verhalten des Testobjektes in bezug auf die Konzentration verschiedener Wuchsstoffe ist letzten Endes wohl nur das sichtbare Zeichen einer Reihe von Gegebenheiten, die im einzelnen in komplizierter Weise ineinandergreifen dürften.

Schon JANKE (1939) hat versucht, hier Einblick zu gewinnen und glaubt, daß Wachstumsbegünstigungen bei niederen Organismen in dieser Hinsicht schon durch bloße Milieuveränderungen, wie z. B. durch Verschiebung des Redox-Potentials, durch Änderung des pH-Wertes, der Viskosität und der Oberflächenspannung bewirkt werden können. Auch manche anscheinend als Wuchsstoffe fungierende Substanzen dürften nach JANKE nur Bausteine der eigentlichen, im lebenden Organismus selbst gebildeten Wuchsstoffe sein.

Unter diesem Gesichtspunkt betrachtet, sind es offensichtlich die mittleren und besonders höheren Dosen, welche solche Umweltsveränderungen

herbeiführen dürften. Ob allerdings auch bei Wuchsstoffen mit „Spurenwirksamkeit“ diese Erklärung ausreichen dürfte, mag dahingestellt sein.

3. Wuchsstoffwirkung und Außenfaktoren.

Die vorstehend genannten Wirkungsbereiche der einzelnen Wuchsstoffe sind jedoch keineswegs als konstante und unabänderliche Größen hinzunehmen. Wie bei der Besprechung des B₁ und des Inosits bereits gezeigt wurde, bewirken schon verhältnismäßig geringe Temperaturschwankungen Änderungen des „Optimalbedarfes“ und gegebenenfalls

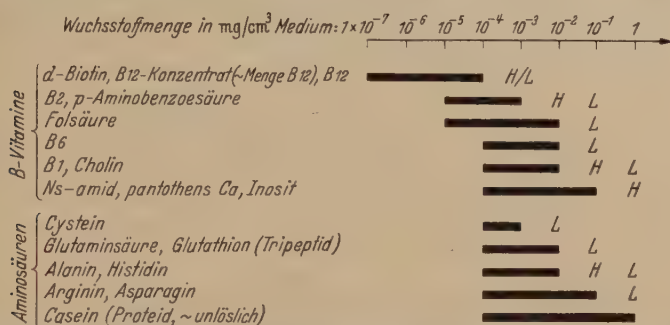


Abb. 16. Wirkung verschiedener Konzentrationen der B-Vitamine und Aminosäuren. Schwarzes Feld: ständige Vermehrungszunahme (nur soweit im Versuch geprüft eingezeichnet!). H = sofortige oder nach 48 Std eingetretene Hemmwirkung. L = Toxizität bzw. Letalwirkung.

auch ein anderes Verhalten der Testobjekte gegenüber höheren Wuchsstoffkonzentrationen. Diese Erscheinungen sind ohne weiteres verständlich, da ja Wachstumsvorgänge nicht vom Kulturmedium allein, sondern auch von Temperatur, Licht, Luftsauerstoff und anderen Außenfaktoren beeinflusst werden. Die Beeinflussung der Teilungsrates und somit auch des Wachstums durch die Temperatur allein ist in Abb. 17 dargestellt [zeitlich aufeinanderfolgende Versuche bei 4 verschiedenen Temperaturen in Knopscher Lösung (ohne Zusatzstoffe)]; 28° C erwiesen sich als optimal.

Nachdem also der Temperatur eine ziemlich wichtige Rolle bei der Beurteilung aller Wuchsstoffversuche zufallen dürfte, ist von einem Einfluß des Lichtes außer bei chlorophyllführenden Arten (vgl. HALL 1941) weniger zu erwarten. Über Beeinflussungen des Wachstums chlorophyllfreier Arten durch das Licht ist m. W. bisher auch noch wenig bekannt. Eigene Versuche brachten ebenfalls keine nennenswerten Ergebnisse. Trotzdem dürfte es sich von Vorteil erweisen, Lichteinwirkungen in Anbetracht der Lichtempfindlichkeit mancher Wuchsstoffe auszuschalten.

Eine Einbeziehung des Luftsauerstoffes in die Betrachtung der Versuchsergebnisse ist notwendig, wenn mit Kulturmedien verschiedener Sauerstoffspannung gearbeitet wird. So schreibt HALL (1941), daß das Wachstum von *Colpidium campylum* bei verringerter Sauerstoffspannung

nahezu um die Hälfte geringer war als unter normal aeroben Verhältnissen: auch bei *Glaucoma piriformis* und *Chilomonas paramaecium* wurde ein solcher Wachstumsrückgang beobachtet.

4. Wachstum und Individuum.

Neben den durch Außen- und Inneneinwirkungen verursachten verschiedenen physiologischen Zuständen der Einzelindividuen ist im Wachstum wohl aller Protozoen eine gewisse Rhythmik zu beobachten, die zum Teil durch Außenbedingungen verursacht wird, jedoch nicht ausschließlich damit erklärt werden kann. Maximale Vermehrungszeiten wechseln ab mit Ruheperioden. Für die *Ciliaten* z. B. sollen sich so zwei jahres-

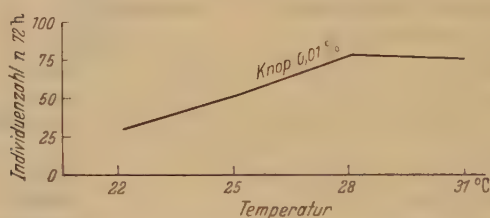


Abb. 17. Einfluß der Temperatur (je 10 Ausgangstiere).

zeitlich bedingte Maxima, eines im Dezember und Januar, das andere im Mai und Juni ergeben (HALL 1941). Inwieweit diese periodischen Wachstumsphasen zu beeinflussen sind, ist bisher noch nicht bekannt. Auf alle

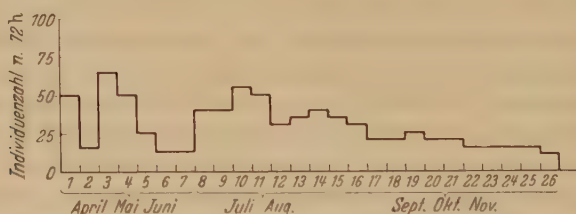


Abb. 18. Schwankungen der Entwicklung in verschiedenen Jahreszeiten. Temperatur 20 -- 23° C (je 10 Ausgangstiere).

Fälle müssen sie vorerst einmal bei der Bewertung der Wachstumsversuche berücksichtigt werden. Dies ist hier zwar in den zeitlich gleichen Kontrollen angestrebt worden (Abb. 18 zeigt, welchen Schwankungen diese unterworfen waren!), doch lassen sich gewisse Unsicherheiten damit nicht gänzlich vermeiden.

Die Festlegung des durchschnittlichen Wachstums findet ihren Ausdruck durch die Anzahl der Teilungen in einer bestimmten Zeiteinheit. Diese durchschnittliche Teilungsfrequenz ist aber letzten Endes das

Ergebnis des physiologischen Gesamtzustandes der Einzelindividuen und dieser wiederum das Endresultat aller wirksamen Innen- und Außenfaktoren. Berücksichtigen wir ferner die wohl zum Teil ererbten Merkmalen entspringenden „individuellen Variationen“ (FRENCH 1940), dann wäre es verfehlt, optimalem Wachstum nur eine einzige Ursache unterschieben zu wollen. Die Gegenwart eines Wuchsstoffes mag für uns so nur ein Anlaß sein, der eine Auslösung von Vorgängen zur Folge hat, die in ihrer Gesamtheit Wachstum und Vermehrung erkennen lassen. Das Problem der „Lebensnotwendigkeit“ oder „Nichtlebensnotwendigkeit“ eines Wuchsstoffes sollte mehr als bisher diese Überlegung berücksichtigen. Man sollte nicht sagen, dieser oder jener Stoff ist notwendig, sondern vielmehr: vermag dieser Stoff Gegebenheiten zu schaffen und Reaktionen auszulösen, die normales Wachstum ermöglichen? Gehen wir von diesem Standpunkt aus, dann fällt die Frage einer angeblichen „Spezifität“ mancher Wuchsstoffe von selbst in sich zusammen und wir begreifen, wie uns eine Fülle von Arbeiten bereits bewiesen hat, daß Derivate von Wuchsstoffen und oft ganz anders geartete „Pseudowuchsstoffe“ die ursprüngliche Wirkung eines Wuchsstoffes übernehmen können.

In diesem Sinne wollen letzthin auch meine eigenen Versuchsergebnisse betrachtet werden. Sie zeigen nur das Gesamtverhalten einer kleinen Anzahl Vertreter einer Art, bringen daher sowohl das Verhalten eines einzelnen Individuums wie auch das der ganzen Art nicht völlig zum Ausdruck. Schwankungen und Veränderungen, sowie oft widersprechende Ergebnisse in Wachstumsversuchen, deuten vor allem darauf hin, daß wir gegenwärtig noch nicht in der Lage sind, alle wachstumsbeeinflussenden Faktoren zu übersehen und zu kontrollieren. Wollten wir die Gesamtheit dieser Faktoren sowie ihre Beziehungen untereinander erfassen, dann müßten wir das Wesen des Lebens selbst zuerst erkannt haben.

Literatur.

- BĚLAR, K.: Untersuchungen der Protozoen. Meth. wiss. Biol. Berlin, Bd. I, 1928. — FRENCH, J. W.: Individual differences in *Paramecium*. J. Comp. Psychol. **30**, 451 (1940). — FRÖBRICH, G.: Untersuchungen über den Vitaminbedarf und Wachstumsfaktoren bei Insekten. Z. vergl. Physiol. **27** (1929). — HALL, R. P., in: RICHARDS, O. W.: „Protozoa in Biological Research“ (Herausgeber CALKINS, SUMMERS), S. 475 ff. New York: Columbia Univ. Press 1941, und in: HARRIS, R. S.: „Vitamins and Hormones“, Academ. Press Inc. Publishers New York, Vol. I 1943 and Vol. III 1945. — HAUROWITZ, F.: Fortschritte der Biochemie 1938—1947. Basel 1948. — JANKE, A.: Die Wuchsstofffrage in der Mikrobiologie. Zbl. Bakter. II, **100**, 409 (1939). — KIDDER, W., and VIRGINIA C. DEWEY: The Biochemistry of Ciliates in Pure Culture, in: ANDRÉ LWOFF: Biochemistry and Physiology of Protozoa. New York: Academy Press Inc. Publishers 1951. (Diese Arbeit war mir nicht zugänglich und konnte nicht mehr berücksichtigt werden!) — KIDDER, G. W., and C. A. STUART: Growth studies on Ciliates, I. The role of bacteria in the

growth and reproduction of Colpoda. *Physiol. Zool.* **12**, 329 (1939). — KOCH, A., K. OFFHAUS, I. SCHWARZ u. J. BANDIER: Symbioseforschung und Medizin. *Naturwiss.* **38**, 339 (1951) (siehe dort auch weitere Literatur!); Untersuchungen über Wachstumsaktivatoren. *Verh. Deutsch. Zoologen Marburg 1950*. — KREITMAIER, G.: Über die Beeinflussung der Vermehrungsrate von *Paramecium caud.* Ehrbg. durch B-Vitamine und Aminosäuren. *Z. für Vitamin-, Hormon- und Fermentforschung*, **4**, **6**, 542 (1952). — LEHNARTZ, E.: Einführung in die chemische Physiologie, 7. Aufl. Berlin 1947. — LWOFF, A.: *Recherches biochimiques sur la nutrition des Protozoaires*, S. 158. Paris 1932. — RUDOLPH, W.: Wuchsstoffe und Antiwuchsstoffe. *Beiheft Internat. Z. Vitaminforschung* **5**, Bern 1948. — STEPP-KÜHNAU-SCHRÖDER: Die Vitamine und ihre klinische Anwendung. Stuttgart: Enke 1951.

Aufnahmebedingungen.

Die Arbeit muß dem Gebiet der Zeitschrift angehören und wissenschaftlich Neues bringen. Arbeiten, die ausschließlich praktischen Zwecken dienen, scheiden aus.

Das Manuskript muß leicht leserlich geschrieben und völlig druckfertig sein; andernfalls sind Verzögerungen im Erscheinen unvermeidlich. Korrekturen im Satz müssen auf das sachlich Notwendige beschränkt werden.

Die Darstellung soll möglichst kurz sein. Ergebnisse dürfen nicht gleichzeitig in Tabellen- und Kurvenform dargestellt werden.

Die Abbildungen sind auf das Notwendigste zu beschränken, insbesondere die Reproduktion von Photos.

Bei einleitenden Literaturbesprechungen soll möglichst auf zusammenfassende Darstellungen verwiesen und nur das zum unmittelbaren Verständnis Notwendige gebracht werden.

Selbständige kritische Sammelreferate über einzelne Gebiete sind erwünscht.

Der Arbeit ist eine Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse im Umfang von im allgemeinen höchstens 1 Seite anzufügen.

Die Zellteilung als Plasmateilung

Von Professor Dr. **Anton Mühldorf**, Wien. Mit 79 Textabbildungen. VIII, 194 Seiten. 1951. DM 19.70

Aus den Besprechungen: Die vielen Fragen, die über den in zahlreichen Varianten sich abspielenden Prozeß der Plasmateilung noch offen stehen, wurden in den letzten Jahrzehnten vollkommen überschattet durch das Interesse, das die Mitoseforschung für sich in Anspruch nahm. Und doch ist ja die Zellteilung nicht allein Kernteilung, sondern auch Plasmateilung. Es ist daher eine sehr gesunde und begrüßenswerte Reaktion gegen einseitige Betrachtungsweise, wenn Mühldorf das Licht nun von den Vorgängen am Kern einmal ab- und auf die im Cytoplasma zublendet. Diese Änderung in der Blickrichtung ist auch zeitgemäß selbst vom Standpunkt des Genetikers aus, der sich in steigendem Maße für die Plasmagene zu interessieren beginnt. Nicht nur dem Karyologen, sondern auch dem Cytoplasmatiker mag diese verdienstvolle Monographie eine erfreuliche Überraschung bieten, denn sie zeigt ihm, wie reich — trotz aller Vernachlässigung — die Literatur über die Plasmateilung heute schon ist. Auf dieser keineswegs schmalen Basis, die Mühldorf liebevoll beleuchtet hat, wird nun wieder weiter aufgebaut werden.

„Protoplasma“

Fortschritte der Botanik

Begründet von **Fritz von Wettstein**

Unter Zusammenarbeit mit mehreren Fachgenossen
und der Deutschen Botanischen Gesellschaft

herausgegeben von

Professor Dr. **Ernst Gäumann**
Zürich

Professor Dr. **Otto Renner**
München

Dreizehnter Band

Bericht über die Jahre 1949—1950

Mit 53 Abbildungen. IV, 387 Seiten. 1951. DM 42.—

A. Morphologie

1. Morphologie und Entwicklungsgeschichte der Zelle. Von Professor Dr. L. Geitler, Wien. (Mit 5 Abbildungen.)
2. Morphologie einschließlich Anatomie. Von Professor Dr. W. Troll und Professor Dr. H. Weber, Mainz. (Mit 27 Abbildungen.)
3. Entwicklungsgeschichte und Fortpflanzung. Von Professor Dr. O. Jaag, Zürich. (Mit 5 Abbildungen.)
4. Sublichtmikroskopische Morphologie*. Von Professor Dr. A. Frey-Wyssling, Zürich.

B. Systemlehre und Pflanzengeographie

- 5a. Systematik und Stammesgeschichte der Pilze. Von H. Kern, dipl. Naturwiss., Zürich. (Mit 2 Abbildungen.)
- 5b. Systematik der Spermatophyta. Von Professor Dr. J. Mattfeld †, Berlin-Dahlem.
6. Paläobotanik*. Von Professor Dr. K. Mägdefrau, München.
7. Systematische und genetische Pflanzengeographie*. Von Professor Dr. F. Firbas, Göttingen.
8. Ökologische Pflanzengeographie. Von Professor Dr. H. Walter, Stuttgart-Hohenheim. (Mit 3 Abbildungen.)
9. Ökologie. Von Professor Dr. Th. Schmucker, Hann.-Münden.

C. Physiologie des Stoffwechsels

10. Physikalisch-chemische Grundlagen der biologischen Vorgänge*. Von Professor Dr. E. Bünning, Tübingen.
11. Zellphysiologie und Protoplasmatis. Von Professor Dr. H.-J. Bogen, Marburg/Lahn.
12. Wasserumsatz und Stoffbewegungen. Von Professor Dr. B. Huber, München. (Mit 3 Abbildungen.)
13. Mineralstoffwechsel. Von Professor Dr. H. Burström, Lund (Schweden). (Mit 1 Abbildung.)
14. Stoffwechsel organischer Verbindungen I. (Photosynthese*). Von Professor Dr. A. Pirson, Marburg/Lahn.
15. Stoffwechsel organischer Verbindungen II. Von Professor Dr. K. Paech, Tübingen.

D. Physiologie der Organbildung

16. Vererbung. Von Professor Dr. H. Marquardt, Freiburg i. Br. (Mit 2 Abbildungen.)
17. Cytogenetik*. Von Professor Dr. J. Straub, Köln-Riehl.
18. Wachstum und Bewegung*. Von Professor Dr. H. v. Guttenberg, Rostock.
19. Entwicklungsphysiologie*. Von Dr. A. Lang, Pasadena (Calif.).
20. Viren. Bakteriophagen. Von Dr. W. Weidel, Tübingen. (Mit 5 Abbildungen.)

Sachverzeichnis.

*) Der Beitrag folgt im Band XIV.

SPRINGER-VERLAG / BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG

Diesem Heft liegen 3 Prospekte des Springer-Verlages, Berlin · Göttingen · Heidelberg, bei.

Springer-Verlag, · Berlin · Göttingen · Heidelberg. — Druck: Wiesbadener Graphische Betriebe GmbH.
Printed in Germany.